



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

**Papel de las 9-lipooxigenasas de
Arabidopsis thaliana en respuesta al daño
en la pared celular**

TESIS DOCTORAL

Ruth Marcos Corrales

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

**Papel de las 9-lipooxigenasas de
Arabidopsis thaliana en respuesta al daño
en la pared celular**

TESIS DOCTORAL

Ruth Marcos Corrales

Licenciada en Biotecnología

DIRECTORA

Carmen Castresana Fernández

Centro Nacional de Biotecnología

Madrid, 2014

Papel de las 9-lipooxigenasas de *Arabidopsis thaliana* en respuesta al daño en la pared celular

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias
por,
Ruth Marcos Corrales

Universidad Autónoma de Madrid,
Noviembre de 2014

VºBº de la Directora de Tesis

VºBº de la Tutora de Tesis

Carmen Castresana Fernández

Marta Martín Basanta

El Doctorando

Ruth Marcos Corrales

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Centro nacional de Biotecnología, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

A continuación quiero expresar mi reconocimiento a todas las personas que han contribuido a la realización del trabajo presentado en esta memoria de Tesis Doctoral.

A la Dra. Carmen Castresana, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, así como por su dirección y guía a lo largo de todos estos años.

A la Dra. Marta Martín, por ofrecerse a ser la tutora de esta tesis y estar siempre disponible para resolver cualquier duda.

Al Profesor Mats Hamberg, por facilitarnos las oxilipinas usadas en este trabajo.

Al Dr. Martjin Rep, de la Universidad de Ámsterdam, por facilitarnos la cepa de *Fusarium oxysporum* Fo5176, así como por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio y la ayuda en la transformación del hongo.

A la Dra. Joanne Chory, del Salk Institute for Biological Studies, California, por cedernos las semillas transgénicas BKI:YFP.

A la Dra. Tamara Velloso, por los análisis de pared celular presentados en este trabajo.

A la Dra. Laura Cuyàs, por su ayuda en los ensayos de microscopía confocal.

A Tomás Cascón, por la excelente labor técnica prestada a lo largo de estos años.

A Yovanny Izquierdo, por su ayuda en la comparación e interpretación de los análisis transcriptómicos.

A todos los miembros del laboratorio 315, por su ayuda y apoyo.

Al personal del Departamento de Genética Molecular de Plantas, por su disponibilidad para la resolución de dudas, colaboración y recomendaciones en los ensayos realizados.

Al servicio de cultivo *in vitro*, por su ayuda en la preparación de medios y siembra de semillas.

Al servicio de invernadero, por su colaboración en el mantenimiento de plantas.

Al Sylvia Gutiérrez y Susana Hernández, por su dedicación en los análisis de microscopía llevados a cabo.

Al servicio de Genómica, por los análisis transcriptómicos presentados en este trabajo.

A Inés Poveda, por la calidad de las fotos realizadas.

A los servicios de Mantenimiento e Instrumentación, por la pronta resolución de los problemas técnicos.

A los departamentos de Personal y Administración, por su ayuda en todos los trámites realizados.

AGRADECIMIENTOS

La escritura de una tesis, como la mayoría de las cosas importantes en la vida, no se puede llevar a cabo sin la ayuda de muchas personas. Personas sin las que esto nunca hubiera llegado a buen puerto, y personas que han hecho el camino más fácil. A continuación, quisiera expresar brevemente mi agradecimiento a todos ellos.

A Carmen, por su paciencia, cercanía y todos los buenos consejos que me han hecho crecer profesional y personalmente durante este tiempo.

A Tomás, por sus inmensas, inmensísimas, ganas de ayudar, tanto dentro como fuera del laboratorio. Tanto tu labor técnica como tu amistad y cariño han sido impagables.

A Tamara, Jorge y Satish por su consejo y guía durante mis primeros pasos en el laboratorio. Gracias por ayudarme a introducirme en este mundo, os agradezco infinitamente vuestras enseñanzas, charlas, consejos y ayuda.

A Yovanny, por ayudarme a desarrollar pensamiento crítico, a defender mis ideas y, sobre todo, a confiar en mí misma, tanto dentro como fuera del trabajo. No tengo palabras para enumerar cuanto te debo. Nunca lo hubiera conseguido sin ti.

A los miembros del 315, Marta, Verónica, Rubén y Ada, por su apoyo y ayuda cuando la he necesitado.

A Guille, por no dejar que traspasara el límite de la locura. Tu pensamiento caótico-neutral y tus charlas filosóficas me han despejado la mente cuando más lo necesitaba. Soy muy afortunada de tener un súper amigo como tú.

A Laura, por esos cafés y conversaciones interminables. Se echan de menos.

A Juani, por estar siempre dispuesta a tomarse una caña y a recorrer todos los bares y restaurantes de Madrid, ayudándome a no pensar en ciencia.

A Lauri y Elisa, por preocuparse siempre por cómo iba todo, darme ánimos y ayudarme.

A los predocs, porque con todas esas cenas, fiestas y charlas el tiempo ha pasado volando.

A mis chic@s del máster. Ana, Vir, Lucio, Marcos, Guille, Irene, Flori, Parras. Por las cenas, los viajes, las fiestas, las risas, los paseos, los gintonics, los karaokes... Momentos innumerables e irrepetibles. Estos cuatro (¡cuatro! Como pasa el tiempo...) años en Madrid no hubieran sido lo mismo sin vosotros.

A Nieves, por estar ahí, año tras año, sin fallar nunca, aunque no siempre me lo haya merecido. Pronto cumpliremos nuestro sueño, ¡NYC! Te mereces lo mejor.

A Tamara. Porque han sido muchos años de amistad, y eres mi pilar inamovible en Salamanca.

A mi familia. Mis padres y mi hermana. Si hay alguien totalmente indispensable sois vosotros.

A toda la gente del Departamento de Genética Molecular de Plantas y del Centro Nacional de Biotecnología, porque con su disposición, trabajo, ayuda, sonrisas y amabilidad han hecho el día a día más fácil.

GRACIAS

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AIR	Residuo insoluble en alcohol
AOS	Aleno óxido sintasa
avr	Avirulencia
CDA	<i>Czapek DOX Agar</i>
CESAs	Celulosa sintasas
CM	Medio de cocultivo
Col-0	Columbia-0
DAMPs	Damage -associated molecular patterns
DES	Divinil éter sintasa
DOX	Dioxigenasa
EAS	Epoxi alcohol sintasa
ET	Etileno
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i>
GPD	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
H₂O₂	Peroxido de hidrógeno
HPL	Hidroperóxido liasa
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HR	Respuesta hipersensible
IM	Medio de inducción
JA	Ácido jasmónico
KB	Medio King'sB
KOH	Hidróxido de potasio
LB	Medio Luria-Bertani
LBman	Medio LB-manitol
LOX	Lipooxigenasa
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
MAMPs	<i>Microbial-associated molecular patterns</i>
MAPKs	MAP kinasa
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MS	Medio Murashige y Skoog
NaCl	Cloruro sódico
NB	<i>Nucleotide binding</i>
NO	Óxido nítrico
¹O₂	Oxígeno singlete
O₂⁻	Ión superóxido
OH⁻	Radical hidroxilo
OPDA	Ácido 12-oxo-fitodienoico
p35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>

PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
POX	Peroxigenasa
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>
PTI	<i>PAMPs-triggered immunity</i>
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
r.p.m.	Revoluciones por minuto
R	Proteína de resistencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
ufc	Unidades formadoras de colonias

Índice

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	9
1.2 RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL	10
1.2.1 Resistencia basal	10
1.2.2 Resistencia inducida	10
1.2.3 Procesos de reprogramación celular	11
1.2.4 El papel de las hormonas vegetales en la defensa de la planta	12
1.2.5 Resistencia sistémica adquirida	14
1.2.6 El papel de la pared celular en la defensa vegetal	14
1.3 BALANCE CRECIMIENTO-DEFENSA	16
1.4 PARTICIPACIÓN DE LAS OXILIPINAS COMO SEÑALES REGULADORAS DE LA INMUNIDAD VEGETAL	16
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	27
3.1.2 Material vegetal	27
3.1.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
3.1.4 Especies fúngicas fitopatógenas	27
3.1.5 Estirpes bacterianas fitopatógenas	27
3.2 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LAS PLANTAS	27
3.2.1 Crecimiento de las plantas <i>in vitro</i>	27
3.2.2 Crecimiento de las plantas en tierra	28
3.3 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	28
3.3.1 Medios de cultivo para bacterias	28
3.3.2 Medios de cultivo para hongos	29
3.4 MANIPULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	29
3.4.1 Obtención de esporas	29
3.4.2 Transformación de <i>Fusarium oxysporum</i>	29
3.5 TRATAMIENTOS EN PLANTAS	30
3.5.1 Inoculación de plantas con el hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	30
3.5.2 Inoculación de las plantas con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i>	31
3.5.3 Tratamientos <i>in vitro</i>	31
3.6 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	32
3.6.1 Tinción de callosa	32
3.6.2 Tinción de lignina	32
3.6.3 Captura de imágenes	32

3.7 ANÁLISIS DE PARED CELULAR	32
3.8 VECTORES DE TRANSFORMACIÓN	33
3.9 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	33
3.9.1 Preparación de ARN total de plantas	33
3.9.2 PCR cuantitativa	34
3.10 ANÁLISIS DE PERFILES TRANSCRIPTÓMICOS	34
4. RESULTADOS	39
4.1 PARTICIPACIÓN DE LOS GENES 9-LOX EN LA SEÑALIZACIÓN DEL DAÑO EN LA PARED CELULAR	39
4.1.1 Las enzimas 9-lipooxigenasas regulan la respuesta al daño en la pared celular	39
4.1.2 Las oxilipinas derivadas de las rutas de las 9-LOXs y 13-LOXs revierten el fenotipo inducido por el isoxaben	42
4.1.3 La aplicación de las oxilipinas 9-KOT y 9-HOT induce la síntesis de brasinoesteroides	43
4.1.4 El efecto del 9-KOT en la respuesta al isoxaben se establece a través de la señalización de los BRs	46
4.1.5 Las oxilipinas 9-KOT y 9-HOT activan la ruta de señalización regulada por los BRs	47
4.1.6 La actividad antioxidante de los tocoferoles inhibe la acción de las oxilipinas como inductoras de la señalización de BRs	48
4.1.7 Las modificaciones de pared celular inducidas por las 9-lipooxigenasas se establecen mediante la señalización de los brasinoesteroides	49
4.1.8 La activación de los BRs favorece la modificación de la pared celular durante la defensa de la planta	50
4.1.9 Las modificaciones de pared celular inducidas por el isoxaben se establecen mediante la señalización de los brasinoesteroides	51
4.1.10 La insensibilidad del mutante <i>noxy2-2</i> al isoxaben está asociada a un defecto en la percepción del daño en la pared celular	53
4.2 PARTICIPACIÓN DE LOS GENES 9-LOX EN LA RESPUESTA DE DEFENSA FRENTA A LA INFECCIÓN DE PATÓGENOS DE RAÍZ	56
4.2.1 La falta de actividad 9-LOX en el mutante <i>lox1lox5</i> aumenta la susceptibilidad de la planta a la infección por <i>Fusarium oxysporum</i> Fo5176	57
4.2.2 La ausencia de actividad 9-LOX favorece la adhesión de <i>Fusarium oxysporum</i> a la raíz de la planta	59
4.2.3 La ausencia de actividad 9-LOX favorece la invasión de <i>Fusarium oxysporum</i> a de los haces vasculares de la raíz	61
4.2.5 Defectos en la señalización de las 9-oxilipinas afectan a la defensa contra <i>Fusarium oxysporum</i>	63
5. DISCUSIÓN	67
6. CONCLUSIONES	75
7. BIBLIOGRAFÍA	79

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Análisis fenotípico de la respuesta a isoxaben.	40
Figura 2. Acción del 9-KOT y el 9-HOT en las respuestas de plántulas silvestres y del mutante <i>lox1lox5</i> a isoxaben.	41
Figura 3. Análisis de la longitud de la raíz en plantas silvestres de <i>Arabidopsis</i> crecidas en isoxaben y oxilipinas.	43
Figura 4. Análisis fenotípico de la respuesta a isoxaben.	43
Figura 5. Respuesta de plántulas silvestres, <i>lox1lox5</i> , <i>bri1-1</i> y <i>det2-1</i> a 9-KOT, 9-HOT y BL.	45
Figura 6. Análisis fenotípico del mutante <i>bri1-1</i> crecido en presencia de oxilipinas.	45
Figura 7. Respuesta de plántulas silvestres, <i>bri1-1</i> y <i>det2-1</i> a 9-KOT y BL.	46
Figura 8. Localización espacial de la proteína BKI:YFP en plantas transgénicas en respuesta al tratamiento por oxilipinas y BL.	47
Figura 9. Comparación de los análisis transcriptómicos de respuesta a 9-KOT y a BR.	48
Figura 10. Formación de depósitos de calosa en las raíces de plántulas silvestres y mutantes tras el tratamiento con isoxaben.	50
Figura 11. Caracterización de la formación de calosa en hojas tras la infección con <i>Pst</i> DC3000.	51
Figura 12. Análisis histológico de los depósitos de lignina tras el tratamiento con isoxaben.	52
Figura 13. Respuesta del mutante <i>noxy2-2</i> y plantas silvestres a isoxaben.	55
Figura 14. Comparación de los análisis transcriptómicos de respuesta a <i>Fusarium oxysporum</i> y a 9-HOT.	57
Figura 15. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y del mutante <i>lox1lox5</i> a la infección por <i>Fusarium oxysporum</i> .	58
Figura 16. Caracterización de la adhesión de <i>Fusarium oxysporum</i> al ápice de la raíz.	60
Figura 17. Caracterización de la invasión de la raíz por el hongo <i>Fusarium oxysporum</i> .	62
Figura 18. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes a la infección por <i>Fusarium oxysporum</i> .	63
Figura 19. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y transgénicas a la infección por <i>Fusarium oxysporum</i> .	64
Tabla 1. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa.	34
Tabla 2. Actividad fenotípica de las oxilipinas usadas en este estudio.	42

Resumen/Abstract

RESUMEN

Las oxilipinas constituyen una amplia familia de derivados lipídicos que se originan a partir de los ácidos grasos linoleico y linolénico por la acción de enzimas α -dioxigenasas (α -DOX) y lipooxigenasas (9- y 13-LOX). Estudios previos realizados en el laboratorio habían demostrado la participación de las enzimas 9-LOX y de sus derivados (9-HOT y 9-KOT) en la respuesta de defensa vegetal, en donde actúan como señales e inducen genes de defensa relacionados con el estrés oxidativo y la modificación de la pared celular. Además, la caracterización de mutantes de *Arabidopsis* insensibles a la aplicación de 9-HOT (mutantes *noxy*) había revelado que las deficiencias en esta ruta de señalización estaban, con frecuencia, asociadas a un defecto en la respuesta de la planta al daño en la pared celular. En este trabajo procedimos al estudio de las 9-LOX como mediadoras de la ruta de integridad de la pared celular, haciendo uso de plantas mutantes *lox1lox5*, deficiente en la síntesis de oxilipinas, y *noxy*, deficientes en su señalización. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el mutante *lox1lox5* posee una mayor susceptibilidad a la inhibición de la síntesis de celulosa provocada por el herbicida isoxaben, mientras que el tratamiento con 9-HOT o 9-KOT produce la reversión parcial de esta respuesta. Además, el uso de mutantes de síntesis y señalización de brasinoesteroides ha permitido demostrar que las 9-oxilipinas inducen procesos de reparación de la pared celular y de defensa, tales como la producción de callosa, mediante la inducción de la síntesis y de la señalización de BRs, y que las 9-LOX y los BRs actúan de forma secuencial en la activación de estas respuestas. La activación de la señalización de BRs inducida por las 9-oxilipinas se inhibe en presencia de trólox, un análogo de los tocoferoles que actúa limitando la peroxidación de lípidos, lo que sugiere que la peroxidación de lípidos puede contribuir a la inducción de la síntesis de BRs.

En este trabajo hemos podido demostrar el aumento de la susceptibilidad de los mutantes *lox1lox5*, *noxy1* y *noxy2* a la infección de *Fusarium oxysporum*, y por tanto el papel de las 9-oxilipinas en la defensa frente a la infección de un patógeno radicular. Finalmente, el hecho de que la sobreexpresión de la proteína NOXY1 provoque un fuerte aumento en la resistencia de plantas de *Arabidopsis* frente a la infección de *Fusarium* apoya la participación de esta proteína en la defensa frente a los patógenos de raíz.

ABSTRACT

The oxylipins are a family of lipids derivatives synthesized by lipoxygenases (9- and 13-LOX) and α -dioxygenases (α -DOX) from linolenic and linoleic acids. Earlier analysis showed the role of 9-LOX in plant defense, and the action of 9-HOT and 9-KOT as defense inducers, by triggering oxidative stress, cell wall modifications and transcriptional reprogramming. Besides, the use of insensitive *noxy* mutants (*non-responding to oxylipins*) showed the importance of the cell wall as a 9-LOX signaling component in *Arabidopsis*. Here, we showed that *lox1lox5* mutants exhibit enhanced susceptibility to isoxaben, an herbicide inhibiting cellulose synthesis and damaging the cell wall, whereas treatment with 9-HOT or 9-KOT partially reversed this effect. In experiments with mutants defective in brassinosteroids (BRs), a class of plant hormones necessary for normal plant growth and cell wall integrity, 9-LOX-derived oxylipins activated cell wall repair and cell wall-based responses such as callose deposition by inducing BR synthesis and signaling. Several lines of evidence indicated that the 9-LOX and BRs pathways act sequentially to trigger these responses. We also observed that the oxylipin-dependent activation of BR signaling is limited by the lipophilic antioxidant trolox, suggesting that oxidative stress and lipid peroxidation trigger BR signaling. Our results show the interaction between the 9-LOX and BR pathways and help to clarify the role of BR and 9-oxylipins in modulating plant defense responses. In addition, we found that *lox1lox5*, *noxy1* and *noxy2* mutant showed enhanced susceptibility to *Fusarium oxysporum*, a root pathogen with plant-cell wall degrading activity. Our results point to a role of 9-LOX in the early defense response against *Fusarium*. Moreover, NOXY1 over-expression enhances *Arabidopsis* resistance against the pathogen, suggesting that *NOXY1* might be a key regulator of 9-LOX-mediated root defense.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Interacción planta-patógeno

Las plantas, en su medio natural, están expuestas a distintos tipos de estrés; abióticos, tales como la sequía, temperaturas extremas, salinidad, etc., y bióticos, causados por microorganismos patógenos capaces de colonizar los tejidos vegetales y provocar una enfermedad.

El ataque de las plantas por microorganismos patógenos permite establecer dos tipos de interacciones denominadas compatibles e incompatibles (Hammond-Kosack y Parker, 2003). En las interacciones incompatibles, el patógeno es capaz de establecer una infección inicial en el área de entrada pero no de progresar e invadir otros tejidos, con lo que la planta es resistente al patógeno y este es avirulento. En cambio, en las interacciones compatibles, el patógeno progresa desde el punto de infección inicial extendiéndose sistémicamente por la planta. En este caso se dice que la planta es susceptible y el patógeno virulento. Por otro lado, y dependiendo de las estrategias utilizadas durante la infección, los patógenos pueden dividirse en dos grandes grupos: patógenos biotrofos, cuando obtienen nutrientes a partir de tejidos vegetales vivos, en cuyo caso la infección no conlleva la muerte de las zonas infectadas; y patógenos necrotrofos, cuando obtienen los nutrientes a partir de tejidos muertos o senescentes, con lo que su estrategia de infección conlleva la muerte de los tejidos vegetales para favorecer su colonización. Existen patógenos en los que el modo de vida no se ajusta estrictamente a uno de estos dos casos, sino que las estrategias de infección varían en las distintas etapas de su ciclo vital o dependiendo de las condiciones del medio, en cuyo caso se les denomina hemi-biotrofos (Glazebrook, 2005).

A su vez, a lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado complejos mecanismos de defensa frente al ataque de los patógenos, que se engloban dentro del llamado sistema inmune vegetal. El sistema inmune de las plantas incluye barreras físicas y químicas preformadas, así como mecanismos activos de defensa que se inducen a través de rutas específicas de señalización. La activación de estas respuestas conduce a la síntesis de compuestos antimicrobianos y al reforzamiento de la pared celular, que contribuirán a dificultar el desarrollo y la progresión del patógeno en la planta. (Dangl y Jones, 2001; Thomma y col., 2001; Hammond-Kosack y Parker, 2003; Kachroo y Kachroo, 2009). A diferencia de lo que ocurre en animales, las plantas no disponen de células inmunes especializadas, sino que todas las células vegetales parecen tener la capacidad para reconocer la presencia de los patógenos y activar la defensa, que dependerá del tipo de patógeno y del tejido infectado.

1.2 Respuesta de defensa vegetal

Se entiende como defensa vegetal todos aquellos mecanismos de defensa que se activan en la planta en respuesta a la presencia de patógenos y se agrupan en dos categorías, denominadas resistencia basal y resistencia inducida.

1.2.1 Resistencia basal

Las plantas poseen un sistema de reconocimiento dirigido a percibir la presencia de los patógenos en los puntos de infección. Este reconocimiento se establece a través de receptores denominados PRR (del inglés *pattern recognition receptor*) localizados, mayoritariamente, en la superficie de la célula vegetal. Estos receptores constan de un dominio transmembrana y un dominio extracelular que participa en el reconocimiento; además, pueden contener un dominio quinasa intracelular que participa en la señalización (Gómez-Gómez y Boller, 2000; Zipfel y col., 2006; Miya y col., 2007; Lehti-Shiu y col., 2009; Zipfel y Robatzek, 2010; Monaghan y Zipfel, 2012). Estos receptores perciben la presencia de moléculas del patógeno de naturaleza variable denominadas MAMPs o PAMPs (del inglés *microbial* o *pathogen-associated molecular pattern*) que están conservadas en distintos microorganismos y son, generalmente, indispensables para el desarrollo del patógeno (Zipfel, 2008; Boller y Felix, 2009). Además, las plantas han desarrollado la capacidad de percibir moléculas endógenas producidas como consecuencia del daño que acompaña a la infección, denominadas DAMPs (del inglés *damage-associated molecular pattern*), entre las que se incluyen fragmentos de la pared celular y péptidos pequeños, cuya acción ejerce un efecto potenciador de la defensa activada por la planta (Boller y Felix, 2009; Malinovsky y col., 2014). La respuesta que se induce tras el reconocimiento de PAMPs y/o DAMPs se denomina resistencia basal o inmunidad inducida (PTI, del inglés *PAMPs-triggered immunity*) y constituye la primera barrera activa frente a la infección. En algunas interacciones planta-patógeno la defensa basal permite contener la infección y es, por tanto, suficiente para evitar la enfermedad de la planta (Zipfel y col., 2004; Jones y Dangl, 2006; Miya y col., 2007)

1.2.2 Resistencia inducida

Además de la resistencia basal, las plantas han desarrollado un segundo nivel de reconocimiento que activa una respuesta de defensa más intensa y eficaz, denominada resistencia inducida. Esta respuesta se establece debido a la interacción específica de los productos de los genes de resistencia de la planta (proteínas R) con efectores microbianos liberados por los patógenos durante la infección. Las proteínas R se localizan

fundamentalmente en el interior de la célula vegetal y constan de una región central de unión a nucleótidos (NB) y de un dominio C-terminal con repeticiones ricas en leucinas (LRR). Estas proteínas pueden reconocer directa o indirectamente a las moléculas efectoras del patógeno, codificadas por los genes de avirulencia o *avr* (Jones y Dangl, 2006) activando una respuesta de resistencia inducida, también denominada resistencia inducida por efector o ETI (del inglés *effector-triggered immunity*). La activación de la resistencia inducida está, generalmente, acompañada de la inducción de un proceso de muerte celular local en el punto de infección, que da lugar a la formación de pequeñas lesiones necróticas y se conoce como reacción hipersensible o HR (Jones y Dangl, 2006; Rosebrock y col., 2007). Esta reacción está destinada a controlar la propagación del patógeno hacia otros tejidos y se induce preferentemente frente a patógenos biotrofos.

1.2.3 Procesos de reprogramación celular

La activación de los receptores PRRs y de las proteínas R, induce un proceso de reprogramación celular en el que se disparan procesos de señalización que en su mayoría son comunes a ambos tipos de inmunidad. No obstante, se han descrito diferencias en los primeros pasos de la señalización, así como en la intensidad y el tiempo de inducción de ambas respuestas (Jones y Dangl, 2006; Tsuda y col., 2009; Tsuda y Katagiri, 2010). A continuación se describen brevemente los procesos de señalización asociados a la activación de una respuesta de inmunidad vegetal

a) Alteración del flujo iónico

El reconocimiento del patógeno produce una alteración del flujo de iones a través de la membrana plasmática que provoca la entrada de H^+ y Ca^{2+} en la célula y a la salida de K^+ y aniones al espacio extracelular. Esta respuesta ocurre en los primeros minutos tras la activación del receptor y conduce a la despolarización de la membrana que contribuye, a su vez, a regular el intercambio iónico (Nürnberg y col., 2004; Shabala y col., 2010).

b) Estallido oxidativo

La despolarización de la membrana plasmática tiene como consecuencia un estallido oxidativo que conlleva la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ión superóxido (O_2^-), el singlete de oxígeno (1O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y las especies reactivas del óxido nítrico (Lamb y Dixon, 1997; Apel y Hirt, 2004; Laloi y col., 2004; Gechev y col., 2006; Triantaphylides y Havaux, 2009; Nanda y col., 2010). La generación de estas especies reactivas puede ocurrir en distintos orgánulos y compartimentos celulares tales como mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas o el espacio extracelular, siendo esta última la que se ha relacionado de forma más concluyente con la activación de la defensa vegetal. Dada su alta toxicidad, las

especies reactivas de oxígeno pueden actuar como compuestos antimicrobianos y contribuir a la muerte de las células infectadas, pero también ejercen otras funciones en la defensa, tales como contribuir al reforzamiento de la pared celular, que dificulta la progresión del patógeno en los tejidos infectados, y la activación de los genes de defensa de la planta (Lamb y Dixon, 1997; Apel y Hirt, 2004; Laloi y col., 2004; Gechev y col., 2006; Triantaphylides y Havaux, 2009; Nanda y col., 2010).

El NO participa en la defensa como señal, modulando la expresión de genes específicos y regulando en el proceso de muerte celular asociado a la HR (Zhang y col., 2003; Lamotte y col., 2004; Parani y col., 2004; Zeidler y col., 2004). Resultados recientes han puesto de manifiesto que el NO interacciona con distintas fitohormonas modificando su producción así como los procesos de señalización regulados por la acción de las hormonas afectadas (Freschi, 2013).

c) Activación de MAPKs

La activación de MAP quinasas es un proceso temprano que dispara cascadas de fosforilación que conducen a la modificación de proteínas tales como factores de transcripción, componentes del citoesqueleto y otras quinasas. Su inducción temprana forma parte de la resistencia basal (Meng y Zhang, 2013)

d) Activación de genes de defensa

Los procesos de señalización descritos conducen, en último término, a la inducción de genes de defensa vegetal que se activan a través de rutas de señalización específicas reguladas por las denominadas hormonas de defensa vegetal. Esta respuesta conlleva un proceso reprogramación celular que permite redirigir el metabolismo de la planta hacia la síntesis de una gran cantidad de compuestos de defensa, y cubrir a la vez las necesidades metabólicas requeridas para el crecimiento y desarrollo vegetal. El balance entre estos dos procesos, síntesis de compuestos de defensa y metabolismo basal, determinará la capacidad de la planta para controlar y sobrevivir a la infección (Jones y Dangl, 2006; Truman y col., 2007).

1.2.4 El papel de las hormonas vegetales en la defensa de la planta

Los estudios realizados durante las dos últimas décadas han permitido demostrar el papel del ácido salicílico (SA), los jasmonatos (JA) y el etileno (ET) como las principales moléculas señalizadoras de la respuesta de defensa vegetal (Thomma y col., 2001; Pieterse y col., 2009). De forma clásica, se considera que la ruta de señalización regulada por la acción del SA controla la resistencia contra patógenos biotrofos y hemibiotrofos, mientras que la combinación de las rutas del ET y JA activa la resistencia frente a patógenos necrotrofos (Glazebrook, 2005) y que estas dos rutas son, en su mayor parte, antagónicas.

El SA es una de las moléculas clave en la resistencia vegetal frente a los patógenos, participando en la activación de la resistencia inducida, el establecimiento de la HR y la limitación del crecimiento de patógenos (Álvarez, 2000; Loake y Grant, 2007; Vlot y col., 2009). A pesar de su importancia, tanto la percepción del SA como su señalización no están del todo caracterizados (Robert-Seilanianantz y col., 2011).

El JA actúan como regulador y activador de la respuesta de defensa frente a la infección por patógenos necrotróficos. La respuesta a JA se activa como consecuencia de su interacción con la proteína COI1 del complejo de ubiquitinación SCF^{COI1} (Browse, 2009; Fonseca y col., 2009; Sheard y col., 2010) seguido de la degradación de los represores JAZ y la liberación de factores de transcripción tales como las proteínas MYC2, ORA59 o ERF1, que actuarán en la inducción de la expresión de genes de defensa (Staswick, 2008; Koo y Howe, 2009; Wu y Baldwin, 2010).

Al igual que el SA y el JA, el ET participa en la regulación de la defensa vegetal en respuesta a la infección de patógenos. La percepción del ET se establece a través de receptores localizados en el retículo endoplasmático que actúan como reguladores negativos de la señalización (Hua y Meyerowitz, 1998). Al aumentar la concentración de ET se produce la inactivación de dichos receptores, y por tanto, la activación de la señalización regulada por esta hormona y en particular la de las proteínas EIN2 y EIN3 (Stepanova y Alonso, 2009). Existen numerosos estudios que demuestran que la ruta de señalización dependiente del etileno actúa de manera coordinada y sinérgica con la del jasmonico (Penninckx y col., 1998; Ellis y Turner, 2001; Onkokesung y col., 2010). Igualmente, la participación del ET contribuye a la activación de la resistencia basal en respuesta a la defensa de microorganismos de tipo biotrofo, en donde EIN3 controla directamente la expresión de FLS2, el receptor de la flagelina. A pesar de promover la acumulación de FLS2, EIN3 reprime directamente la síntesis de SA. Por ello, los mutantes de etileno, como el *ein2-1* muestran resistencia a *Pseudomonas*, a pesar de estar afectados en la señalización a partir de FLS2 (Chen y col., 2009; Boutrot y col., 2010).

Los estudios dirigidos a definir el papel de las hormonas de defensa de la planta han puesto de manifiesto que las rutas de señalización involucradas en la defensa de la planta no son independientes, sino que interactúan entre sí estableciendo una compleja red de comunicación, cuya coordinación juega un papel esencial en la respuesta de defensa (Koornneef y Pieterse, 2008; Lopez y col., 2008; Spoel y Dong, 2008; Robert-Seilanianantz y col., 2011; Thaler y col., 2012; Gimenez-Ibanez y Solano, 2013). Este complejo sistema de regulación es utilizado con frecuencia por los patógenos para interferir con los mecanismos de defensa de la planta. Por ejemplo, es sabido que algunos patógenos poseen la capacidad de sintetizar hormonas vegetales y compuestos funcionalmente homólogos a

los producidos por la planta lo que les permite manipular el metabolismo de la planta en su propio beneficio (Cristescu y col., 2002; Nomura y col., 2005; Robert-Seilanianantz y col., 2007). El caso mejor caracterizado es el de la coronatina, una toxina producida por la bacteria *Pseudomonas syringae* que mimetiza la acción del JA, inhibiendo la activación de la señalización dependiente de SA (Brooks y col., 2005; Uppalapati y col., 2007). De la misma manera, los efectores liberados por los patógenos durante la infección actúan sobre el metabolismo de la planta y lo redirigen para favorecer su desarrollo e interferir con la activación de la respuesta de defensa (Flors y col., 2008; de Torres Zabala y col., 2009).

1.2.5 Resistencia sistémica adquirida

La activación de una respuesta de defensa en la zona de infección, denominada defensa local, está con frecuencia acompañada de la adquisición de un estado de defensa generalizado en la planta, denominado resistencia sistémica adquirida o SAR (del inglés *systemic acquired resistance*) que se transmite en sucesivas generaciones y protege a la planta frente a infecciones secundarias. Estudios recientes han puesto de manifiesto que la inducción de una respuesta de defensa sistémica (SAR) consiste en la activación de un estado fisiológico denominado “*priming*” que se establece mediante modificaciones epigenéticas específicas en los genes de defensa de la planta que facilitarán su activación de forma rápida y eficaz en respuesta a la infección de un nuevo patógeno (Durrant y Dong, 2004; Grant y Lamb, 2006; Shah, 2009; Shah y col., 2014). La respuesta sistémica puede ser inducida por la acción de patógenos, así como de organismos no patogénicos o por la aplicación directa de PAMPs (Mishina y Zeier, 2007) y su inducción está asociada al aumento en los niveles de ácido salicílico (van Loon y col., 2006). Los estudios realizados con objeto de identificar la naturaleza de la señal sistémica que debe producirse en la hoja infectada y trasladarse al resto de la planta para inducir el estado de *priming*, han permitido identificar distintos compuestos que, en numerosas ocasiones, corresponden a moléculas de naturaleza de lipídica, entre las que se encuentran las oxilipinas derivadas de la acción de las enzimas 9-LOX, así como oxilipinas producidas de forma no enzimática (Maldonado y col., 2002; Chaturvedi y col., 2008; Vlot y col., 2008; Kwon y col., 2009; Chanda y col., 2011).

1.2.6 El papel de la pared celular en la defensa vegetal

La pared celular contribuye a mantener la estructura y la integridad de las células vegetales y constituye la primera barrera, tanto física como química, que encuentran los patógenos al entrar en contacto con la planta.

De forma generalizada, la pared celular se compone de una red de fibras de celulosa entrecruzadas entre sí a través de otros polisacáridos o hemicelulosas, que le confieren rigidez. Esta estructura está embebida, a su vez, en una matriz de pectinas que contribuye a mantener su integridad (Scheller y Ulvskov, 2010; Malinovsky y col., 2014). La celulosa es el componente primario de la pared y consiste en cadenas de glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) que se sintetizan por la acción de complejos multiméricos de celulosa sintasas (CESAs) (Endler y Persson, 2011). La importancia estructural y funcional de este polisacárido se concluye a partir de los resultados que demuestran la existencia de mecanismos dirigidos a paliar la disminución de la síntesis de celulosa o el defecto en su deposición. Así, por ejemplo, la reducción de celulosa en mutantes deficientes en la actividad de las celulosas sintasas está con frecuencia acompañada de un aumento en el proceso de lignificación (Ellis y Turner, 2001; Caño-Delgado y col., 2003; Hamann, 2012). En apoyo de estos resultados, el tratamiento con el herbicida isoxaben, inhibidor de la celulosa sintasa, induce la acumulación ectópica de lignina ante la reducción de los niveles de celulosa (Hamann y col., 2009; Denness y col., 2011; Hamann, 2012).

Los mecanismos de compensación que se activan en respuesta a la reducción de los niveles de celulosa incluyen también un proceso de reprogramación transcripcional, en el que se modifica la expresión de un alto número de genes de la planta, entre los que se encuentran genes relacionados con la defensa frente a patógenos y con la pared celular. Además, es importante mencionar que la respuesta provocada por la deficiencia en celulosa va acompañada de un aumento de la resistencia de la planta frente a la infección por patógenos (Ellis y Turner, 2001; Caño-Delgado y col., 2003; Hamann, 2012). Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de una ruta de señalización, denominada ruta de la integridad de la pared celular, dirigida a reparar el daño de la pared celular asociado a la infección por patógenos.

La respuesta de defensa de la planta asociada a la pared celular incluye otras modificaciones, tales como la acumulación de depósitos de callosa, un polímero de glucosa con enlaces β -1,3-glucano que se deposita en forma de papilas en los puntos de infección y contribuye a reforzar la pared celular para evitar la penetración del patógeno y confinarlo a la zona de infección (Boller y Felix, 2009; Underwood, 2012).

Por su parte, y para combatir la presencia la pared celular y la activación de la defensa asociada al daño, los patógenos han desarrollado numerosas estrategias de infección para penetrar en la planta. Muchos patógenos se sirven de aperturas naturales, como los estomas e hidatodos de las hojas o las aperturas radiculares en la zona de emergencia de las raíces laterales, mientras que otros producen un arsenal de enzimas capaces de degradar la pared (Walton, 1994; Nuhse, 2012; Malinovsky y col., 2014).

1.3 Balance crecimiento-defensa

La activación de la respuesta de defensa vegetal interfiere con el metabolismo basal de la planta, ya que supone redirigir una parte importante de la reservas de la célula hacia la producción de los compuestos de defensa. Igualmente, la respuesta de reforzamiento de la pared celular interfiere con las necesidades de la planta para proseguir su desarrollo (Denance y col., 2013). La interferencia descrita se evidencia en plantas mutantes y transgénicas con expresión constitutiva de genes de defensa, en las que se observa que el aumento de la resistencia a la infección afecta de forma negativa al desarrollo de las plantas; estas plantas basalmente resistentes son más pequeñas que las plantas control y en ocasiones muestran lesiones necróticas espontáneas en ausencia de patógenos (Robert-Seilaniantz y col., 2011). En este contexto, cabe mencionar que la participación de las hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas y brasinoesteroides) en la defensa vegetal contribuye a regular el balance crecimiento-defensa necesario para distribuir los recursos de la planta y asegurar su supervivencia y desarrollo (Lopez y col., 2008; Choi y col., 2011; Robert-Seilaniantz y col., 2011; Denance y col., 2013; Gimenez-Ibanez y Solano, 2013).

Los brasinoesteroides (BRs) participan en la regulación del crecimiento y del desarrollo de la planta, así como en procesos de reparación de la pared provocados por la alteración en la composición de esta. La percepción de BRs por el receptor BRI1 provoca la disociación del inhibidor BKI y el reclutamiento del correceptor BAK1, esencial para activar la señalización (Jalloul y col., 2002; X. Wang y Chory, 2006). Como consecuencia, se provoca la inhibición de la quinasa BIN2 y la activación de los factores de transcripción *BES1* (o *BZR2*) y *BZR1*, implicados en la regulación de la mayor parte de los genes de respuesta a BRs (Li y Nam, 2002; Z. Y. Wang y col., 2002; Y. Yin y col., 2002a). Estudios recientes, dirigidos a examinar el papel de los BRs en la regulación del balance crecimiento-defensa, han puesto de manifiesto la participación de los BRs en estos procesos, en donde parece que actúan como inductores del crecimiento vegetal. Aún así, existe una importante controversia a este respecto que requiere una caracterización más extensa (Albrecht y col., 2012; Belkhadir y col., 2012).

1.4 Participación de las oxilipinas como señales reguladoras de la inmunidad vegetal

Las oxilipinas constituyen una familia de derivados lipídicos sintetizados a partir de ácidos grasos de membrana con funciones en la señalización de procesos de desarrollo y de defensa vegetal. Las oxilipinas representan los equivalentes vegetales de los

eicosanoides de mamíferos, que se sintetizan a partir del ácido araquidónico y juegan un papel relevante como señales en la regulación de procesos de desarrollo y en la respuesta inmune. Las funciones asignadas a los eicosanoides, así como su actuación a través de receptores específicos, han sido ampliamente descritas en animales y su importancia claramente demostrada, lo que ha aumentado el interés por sus equivalentes vegetales (Funk, 2001; Haeggstrom y Funk, 2011; H. Yin y col., 2013).

a) Biosíntesis de oxilipinas

La formación de oxilipinas se inicia a partir de la liberación de ácidos grasos de las membranas por la acción de lipasas, que a continuación son transformados en hidroperóxidos a través de vías enzimáticas o no enzimáticas. La transformación enzimática de los ácidos grasos se lleva a cabo por la acción de enzimas con actividad lipooxigenasas o α -dioxigenasas (Hamberg y col., 1999; Feussner y Wasternack, 2002) que incorporan oxígeno molecular en los ácidos grasos, generando los correspondientes hidroperóxidos. Estos hidroperóxidos son transformados por actividades enzimáticas secundarias tales como aleno óxido sintasas (AOS), divinil éter sintasas (DES), hidroperóxido liasas (HPL), peroxigenasas (POX) y epoxi alcohol sintasas (Li y col.), dando lugar a un gran número de derivados lipídicos con distinta estructura molecular (Blée, 2002; Howe y Schilmiller, 2002; Liavonchanka y Feussner, 2006; Mosblech y col., 2009). La presencia de oxígeno singlete o radicales libres provoca la incorporación no enzimática de oxígeno en los ácidos grasos, generando hidroperóxidos, hidróxidos y fitoprostanos, los cuales también forman parte del metaboloma de oxilipinas de la planta y cuyas funciones y características, especialmente las de los fitoprostanos, han sido también objeto de estudio (Mueller y Berger, 2009).

Las lipooxigenasas catalizan la incorporación de oxígeno molecular en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). En plantas, las lipooxigenasas se clasifican en dos tipos, dependiendo del carbono del ácido graso en el que tiene lugar la oxigenación: las 9-lipooxigenasas incorporan el oxígeno en el carbono 9 del ácido graso, mientras que las 13-lipooxigenasas incorporan el oxígeno en el carbono 13. Por otro lado, las α -dioxigenasas catalizan la oxigenación de los ácidos grasos en el carbono 2 del esqueleto de carbonos, y muestran homología con las prostaglandinas sintasas caracterizadas en mamíferos (Hamberg y col., 2002; Koszelak-Rosenblum y col., 2008). Los estudios realizados con objeto de identificar los genes que codifican estas actividades enzimáticas en plantas de *Arabidopsis thaliana* han permitido identificar seis genes lipooxigenasas (AtLOX1 a AtLOX6), de los cuales las proteínas LOX1 y LOX5 poseen actividad 9-lipooxigenasa, mientras que las enzimas LOX2, LOX3, LOX4 y LOX6 actúan como 13-lipooxigenasas (Bannenberg y col., 2009a). Igualmente, se ha podido identificar la presencia de dos genes

α -dioxigenasa, denominados α -DOX1 y α -DOX2, que catalizan la misma reacción enzimática (Hamberg y col., 2002; Koszelak-Rosenblum y col., 2008).

b) Funciones de las oxilipinas

Los estudios dirigidos a caracterizar la función de las oxilipinas han permitido demostrar su participación en la regulación de procesos clave relacionados con el desarrollo y la defensa de la planta. Los trabajos que han puesto de manifiesto que la expresión de los genes de síntesis de oxilipinas se inducen en respuesta a la infección de patógenos y que la respuesta a la infección de plantas mutantes y líneas transgénicas alteradas en la síntesis de oxilipinas varía con respecto a la de las variedades silvestres (Ponce de León y col., 2002; Farmer y col., 2003; Hwang y Hwang, 2010; Nalam y col., 2012) señala la importancia de estos metabolitos durante la interacción planta-patógeno.

Aunque la función de muchas de las oxilipinas identificadas es desconocida, la participación del ácido jasmónico como activador transcripcional ha sido ampliamente demostrada. El jasmónico participa en procesos tales como la defensa frente a patógenos necrotrofos, la respuesta a herida, la protección frente a insectos, la maduración del polen y la senescencia (Santino y col., 2013; Wasternack y Hause, 2013). Otros compuestos derivados de la ruta de las 13-LOXs, como el 12-Oxo-PDA, precursor del jasmónico, también actúan como reguladores de genes de defensa vegetal y en algunos casos se les ha podido asignar actividad antimicrobiana (Farmer y col., 2003; Prost y col., 2005).

El papel de las α -dioxigenasas en la defensa de la planta frente a patógenos biotrofos ha sido documentado, así como su papel como reguladoras del proceso de daño celular asociado a la activación de la reacción hipersensible, en la activación de la respuesta sistémica de defensa y en la defensa frente al ataque de insectos (Steppuhn y col., 2010; Vicente y col., 2012). Igualmente, las α -dioxigenasas regulan procesos del desarrollo, como se concluye de los resultados que muestran que la falta de actividad α -DOX2 en plantas de tomate provoca importantes alteraciones fenotípicas, mientras que en plantas de tabaco y *Arabidopsis* se observa la activación en los niveles de esta enzima en distintos tejidos de plantas sanas así como en distintos estados de desarrollo (Bannenberg y col., 2009b; Steppuhn y col., 2010).

Finalmente, cabe mencionar que los resultados obtenidos en la caracterización de las oxilipinas derivadas de la ruta de las 9-LOXs demuestran su participación en una gran variedad de procesos de defensa (Rancé y col., 1998; Vellosillo y col., 2007; Hwang y Hwang, 2010; Lopez y col., 2011). Así, el estudio de estas oxilipinas ha permitido demostrar su participación en la activación del cierre de los estomas en respuesta a la presencia de la bacteria *Pst* DC3000 (Montillet y col., 2013). Igualmente, la caracterización de mutantes de *Arabidopsis* carentes de actividad 9-lipooxigenasa ha puesto de manifiesto

el papel de estas oxilipinas en la activación de la defensa local y que, junto con las oxilipinas derivadas de las α -DOXs, contribuyen a la activación de la defensa sistémica en *Arabidopsis* (Hamberg y col., 2003; Vellosillo y col., 2007; Vicente y col., 2012). El estudio de estas respuestas indica que la acción de las oxilipinas se establece a través de su interacción con rutas de señalización reguladas por hormonas vegetales tales como el ABA y el ET así como de su papel en el control del estrés oxidativo y de la peroxidación de lípidos (Lopez y col., 2011).

El análisis funcional de oxilipinas ha permitido caracterizar la acción de las oxilipinas 9-hidroxi-10, 12, 15-octadecatrienoico (9-HOT) y 9-keto-10, 12, 15-octadecatrienoico (9KOT), derivadas de la actividad 9-LOX, como inductoras de la respuesta de defensa tanto en hojas como en tejidos de raíz, en donde activan de la expresión de genes de defensa, así como de genes relacionados con el estrés oxidativo y la modificación de la pared celular. De acuerdo a estos resultados, la obtención y caracterización de plantas mutantes (*noxy*, del inglés *non-responding to oxylipins*), afectadas en la señalización de las respuestas a 9-HOT y 9-KOT, ha permitido comprobar la participación de estas oxilipinas en la activación de la respuesta de defensa de la planta frente a la infección de bacterias hemibiotrofas, así como frente al daño en la pared celular. Estos resultados se ponen de manifiesto por los estudios que demuestran que la insensibilidad a la aplicación de 9-HOT y 9-KOT conlleva la alteración de la respuesta de defensa y, en muchos casos, la insensibilidad a la aplicación de isoxaben, un inhibidor de las celulosas sintetas que activa la ruta de la integridad de la pared celular (Vellosillo y col., 2007; Vellosillo y col., 2013).

Estos resultados sugerían que las enzimas 9-LOX forman parte de la denominada ruta de la integridad de la pared celular que se activa en respuesta al daño causado durante la infección y que contribuye a limitar el crecimiento y el progreso del patógeno en la planta (Vellosillo y col., 2007; Vellosillo y col., 2013). En el presente trabajo hemos continuado estos estudios, procediendo a examinar el papel de las enzimas 9-LOX en la respuesta al daño en la pared celular de la planta, así como los procesos de señalización regulados por la acción de las 9-oxilipinas en esta respuesta.

De forma paralela, y en base a los resultados que demuestran la presencia de altos niveles de actividad 9-LOX en la raíz de plantas sanas y la acumulación en estos tejidos de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT (Vellosillo y col., 2007; Vicente y col., 2012), nos propusimos investigar el papel de las 9-LOXs en la defensa de la planta frente a la infección de patógenos de raíz, en donde la pared celular representa una importante barrera defensiva para evitar la infección. Para llevar a cabo este estudio, se seleccionó el patógeno *Fusarium oxysporum*, un hongo devastador que coloniza la raíz de numerosos cultivos, produciendo importantes pérdidas económicas (Armstrong y Armstrong, 1981; Michielse y Rep, 2009).

Fusarium puede sobrevivir en el suelo en estado quiescente hasta detectar la presencia de un huésped, en cuyo caso penetra en la raíz a través del córtex, degradando la pared y llegando al xilema en la zona de elongación, donde los vasos no están suberizados y la entrada del hongo no se ve impedida. El crecimiento del hongo en el xilema bloquea el movimiento de agua, con lo que el sistema vascular acaba colapsando y el agua no llega a las hojas, produciendo el marchitamiento (Tjamos y Beckman, 1989; Pietro y col., 2003; Okubara y Paulitz, 2005). El estudio de la interacción de plantas de *Arabidopsis* con *Fusarium oxysporum* ha puesto de manifiesto el papel del SA en la activación de la defensa frente a este hongo (Berrocal-Lobo y Molina, 2004; Edgar y col., 2006) y que la deficiencia en la activación de la señalización del JA confiere resistencia a la planta (Kidd y col., 2009; Thatcher y col., 2009). Igualmente, cabe mencionar que el análisis de plantas mutantes ha permitido identificar genes de resistencia en *Arabidopsis* denominados *RF01* a *RF07*, que participan en la protección de la plantas frente a varias *formae speciales* (Diener y Ausubel, 2005; Shen y Diener, 2013). Estos resultados ponen de manifiesto el interés en el estudio de la interacción de *Fusarium* con la raíz de la planta, así como de los mecanismos de defensa que regulan la infección de patógenos en la raíz que, en gran medida, son desconocidos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

El interés de este trabajo está dirigido a profundizar en el estudio de la ruta de síntesis de oxilipinas iniciada por la acción de las enzimas 9-lipooxigenasas con objeto de determinar su función en los procesos de señalización que contribuyen a la modificación la pared celular y a la activación de la defensa vegetal, así como de examinar la participación de estas oxilipinas en los mecanismos de defensa de la planta frente a la infección de patógenos radiculares.

Para abordar estos objetivos, hemos empleado plantas mutantes deficientes en la síntesis (*lox1lox5*) y en la señalización (*noxy*, del inglés *non-responding to oxylipins*) de las 9-oxilipinas, en las que hemos procedido a caracterizar la respuesta al daño celular provocado por el herbicida isoxaben y por el hongo patógeno *Fusarium oxysporum*. En estos estudios hemos realizado la caracterización fenotípica de las plantas mutantes y silvestres frente a los tratamientos de interés y analizado en detalle las respuestas examinadas. Los resultados obtenidos han permitido establecer la participación de las 9-oxilipinas en los procesos examinados y demostrar su interacción con otras rutas hormonales, a través de las cuales ejercen su actividad.

Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.2 Material vegetal

La planta modelo utilizada en este estudio ha sido *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0). Los mutantes utilizados *lox1lox5*, *noxy1*, *noxy2-2*, *bri1-1*, *det2-1*, *bes1-D*, *bzr1-1D*, *coi1-1* y *aos* y las líneas transgénicas 35S:NOXY1 y 35S:NOXY2, disponibles en el laboratorio, así como la línea 35S:BKI-YFP se encuentran en fondo Col-0 en todos los casos.

3.1.3 *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa EHA105 conteniendo el plásmido pEHA105 con resistencia a kanamicina se empleó para la transformación de *Fusarium* con las construcciones de interés. (Mullins y col., 2001). Las bacterias se cultivaron a 28 °C durante dos días en medio LB con kanamicina (50µg/ml) como antibiótico de selección.

3.1.4 Especies fúngicas fitopatógenas

En los ensayos de patogenicidad realizados en este trabajo se utilizó la cepa *Fo5176* del hongo *Fusarium oxysporum*. Para los ensayos de visualización en placa se utilizó la cepa transgénica de *Fusarium oxysporum* transformada con la proteína verde fluorescente bajo el control de un promotor constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) de *Fusarium*.

3.1.5 Estirpes bacterianas fitopatógenas

Para los ensayos de deposición de callosa en hoja se utilizó la cepa bacteriana fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Whalen y col., 1991)

3.2 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LAS PLANTAS

3.2.1 Crecimiento de las plantas *in vitro*

Para su crecimiento *in vitro* las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas con una mezcla de lejía 75% y Tween-20 (0,1%) durante 7 minutos; a continuación, se lavaron con agua MilliQ estéril repetidamente para su posterior estratificación en oscuridad a 4°C durante tres días. Las semillas se germinaron en medio MS 0,5x suplementado con 1% de sacarosa y el pH se ajustó a 5,7 usando KOH (1 M). Para el crecimiento vertical de plántulas, se incrementó la concentración de agar del medio hasta alcanzar un

concentración del 1,5%, mientras que en el crecimiento de las seedlings en horizontal se utilizó una concentración final de agar del 0,7%. Las placas se sellaron con cinta Micropore porosa (3M Health Care, St. Paul, MN) y se crecieron en cámaras climáticas a una temperatura de 21° y humedad relativa del 50%.

3.2.2 Crecimiento de las plantas en tierra

Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron en bandejas de alveolos sobre una mezcla de tierra con vermiculita en proporción 3:1. Las bandejas se cubrieron con plástico y se estratificaron a 4°C durante tres días. Posteriormente, las plantas se crecieron en el invernadero o en cámaras de cultivo con 14h de luz, temperatura de 21°C y humedad relativa del 60%, exceptuando las plantas utilizadas para las infecciones con *Fusarium*, en cuyo caso se crecieron a 25°C y 70% de humedad. A los 3 días de germinación los plásticos utilizados para preservar la humedad se retiraron para continuar el crecimiento de las plantas. Las infecciones se realizaron entre las 2 y las 4 semanas de crecimiento.

3.3 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

3.3.1 Medios de cultivo para bacterias

- Medio Luria-Bertani (LB): Para el crecimiento de *A. tumefaciens*. 1% de bacto triptona, 0,5% de extracto de levadura y 1% de cloruro sódico (NaCl).
- Medio LBmanitol (LBman): Para el crecimiento de *A. tumefaciens*. Medio LB con un 1% de manitol.
- Medio King's B (KB): Para el crecimiento de *Pseudomonas*. 2% proteosa peptona, 2% glicerol, 6,5 mM K₂HPO₄ y 6 mM MgSO₄·7H₂O.
- Medio 2xYt (2YT): Para el crecimiento de *A. tumefaciens* anterior a la transformación de *Fusarium*. 1,6% de bacto triptona, 1% de extracto de levadura y 0,5% de NaCl.
- Medio de cocultivo (CM): Para el crecimiento de *A. tumefaciens* y *F. oxysporum* durante la transformación del hongo. Igual que el medio de inducción, pero con un 0,5% de glucosa en vez de un 1%, y añadiendo 1,5% de bactoagar. La concentración de acetosiringona depende de la cepa de *Agrobacterium* usada.

3.3.2 Medios de cultivo para hongos

Los medios utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *Fusarium oxysporum* fueron los siguientes:

- Medio PDA: Para el crecimiento rápido del hongo en medio rico en nutrientes. 4g/l de extracto de patata, 20 g/l de glucosa, 15g/l de agar.
- Medio CDA: Para la conservación del hongo a medio plazo. 2g/l de NaNO_3 , 0,5g/l de KCl, 0,5g/l de glicerofosfato de magnesio, 0,01g/l de FeSO_4 , 0,32g/l de K_2SO_4 , 30g/l de sacarosa y 12g/l de agar.
- Medio NO_3 : Para la inducción de esporas. 0,17% de *Yeast nitrogen base*, 3% de sacarosa y 100mM de KNO_3 .
- Medio de inducción (IM): Para el crecimiento de *F. oxysporum* antes de su transformación. 1% de fosfato potásico dibásico 1M (K_2HPO_4), 1% de fosfato potásico monobásico 1M (KH_2PO_4), 0,25% de NaCl 1M, 0,4% de sulfato amónico 1M ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0,5% de glicerol. Después de esterilizar se le añade 0,1% de sulfato de hierro II 9mM (FeSO_4), 1% de glucosa 1M, 4% de MES 1M a pH5,3, 0,14% de cloruro cálcico 0,5 M (CaCl_2), 0,2% de sulfato de magnesio 1M (MgSO_4), acetosiringona (cantidades variables).

3.4 MANIPULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

3.4.1 Obtención de esporas

Para la obtención de esporas se inocularon 100ml de medio NO_3 con una pieza de CDA procedente de una placa conteniendo el hongo crecido durante al menos una semana. El cultivo líquido se crece de 3 a 5 días a 25°C y 250 rpm. Estos cultivos se filtran a través de miracloth estéril y el filtrado resultante se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm en tubos de 50 ml. El pellet se resuspende en 10 ml de agua MilliQ estéril y se estima la concentración de esporas haciendo uso de un hemocitómetro. La suspensión de esporas se diluye a la concentración requerida (10^6 esporas/ml para la infección en tierra, 10^5 esporas/ml para la visualización de fluorescencia).

3.4.2 Transformación de *Fusarium oxysporum*

La transformación de la cepa silvestre de *Fusarium oxysporum* se llevó a cabo mediante un protocolo de transformación utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Mullins y col., 2000). La cepa de *Agrobacterium* se creció durante tres días a temperatura ambiente en placas de LBman/agar con los antibióticos apropiados. A partir de estas placas se

inocularon cultivos de 5 ml de 2YT suplementado con antibióticos y se incubaron a 28-30°C durante 24 horas a 220 rpm. Una vez crecidas hasta una densidad óptica de 0,45 ($\lambda=660$), se tomaron 10 ml de estos cultivos, se centrifugaron durante 3 minutos a 3000 rpm y se resuspendió el pellet en medio de inducción suplementado con acetosiringona. Las bacterias resuspendidas se incubaron a 28°C durante 6 horas sin agitación.

Por otra parte, se aislaron esporas de *Fusarium oxysporum* Fo5176 y se diluyeron en medio IM a una concentración de 2×10^6 esporas/ml.

Se mezcló a partes iguales el cultivo de *Agrobacterium* con el de *Fusarium*, y se pipetearon 25 μ l sobre filtros ME25 cortados en cuatro partes y colocados sobre placas de CM suplementado con acetosiringona. Estas placas fueron incubadas a 25°C durante dos días y, pasado ese tiempo, los filtros fueron transferidos a placas de CDA suplementadas con antibióticos. Las colonias crecidas en estas placas son posibles transformantes, con lo cual se transfirieron a placas de PDA con antibióticos y se incubaron durante 3 días a 25 °C. De estas placas se aislaron colonias individuales que se crecieron por separado en placas de CDA. Las colonias de hongo transformado se seleccionaron mediante visualización al microscopio de fluorescencia.

3.5 TRATAMIENTOS EN PLANTAS

3.5.1 Inoculación de plantas con el hongo *Fusarium oxysporum*

La infección de plantas con el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* se realizó sumergiendo las raíces de las plantas en una suspensión de 10^6 esporas/ml utilizando plantas crecidas en tierra durante 2 semanas, a las que se limpió la raíz con agua tras extraerlas de los alveolos, para sumergirlas durante 5 minutos en la solución de esporas, y volver a replantarse en alveolos nuevos. Las plantas utilizadas como control de la infección se trataron de la misma manera sumergiendos en agua durante 5 min antes de replantarlas en nuevos alveolos.

La respuesta de infección se valoró calculando el porcentaje de plantas que mostraban síntomas de infección de acuerdo a la escala establecida (descrita en la sección resultados, apartado 4.2.1), así como la reducción del crecimiento producida por la infección en comparación al tratamiento control en los distintos genotipos. Se examinaron al menos 25 plantas de cada genotipo en tres experimentos independientes.

Para la observación de la infección utilizando la cepa de hongo con la construcción GPD:GFP, se utilizaron plantas crecidas en placas verticales durante 7 días, que fueron transferidas a tubos de 1,5 ml que contenían una solución de esporas de 10^5 esporas/ml.

La infección se visualizó a las 24h, dos días y tres días tras la inoculación. Se examinaron al menos 15 plantas de cada genotipo en tres experimentos independientes.

3.5.2 Inoculación de las plantas con la bacteria *Pseudomonas syringae*

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se inocularon a las 3-4 semanas de desarrollo en las hojas de la roseta basal con la bacteria fitopatógena *Pst* DC3000. La inoculación se realizó por inyección, a través del envés de la hoja, utilizando jeringuillas de 1 ml plastipak estériles (Becton Dickinson), presionando suavemente con la jeringuilla sobre la superficie foliar.

Las suspensiones bacterianas se prepararon a partir de un césped bacteriano crecido a 28°C durante 24 horas en una placa con medio KB sólido y suplementado con kanamicina (50mg/ml). Tras ese tiempo la bacteria se resuspendió en MgCl_2 10 mM hasta alcanzar la densidad óptica de 0,1, correspondiente a 10^7 ufc/ml. Para cada genotipo se examinaron un mínimo de 15 plantas en tres experimentos independientes.

3.5.3 Tratamientos *in vitro*

El análisis de respuesta de las plantas a la presencia de oxilipinas, hormonas vegetales y otros compuestos de interés se realizó mediante ensayos *in vitro* en las condiciones anteriormente citadas. Para los análisis histológicos y fenotípicos, las semillas se germinaron verticalmente en placas cuadradas y se a los cuatro días se transfirieron a placas suplementadas con los compuestos de interés a las concentraciones seleccionadas: 9-HOD, 9-HOT, 9-KOD, 9-KOT, 9,10-KHOE, 13-HOT, 13-HOD, 13-KOD y 12,13-KHOD a 25µM; 2-HOE a 75µM; 9-oxo-C9 a 20 µM; OPDA a 5µM; JA a 20µM; isoxaben a 10, 20 y 30 nM; epi-brasinólido a 10 nM; brasinazol a 1 µM; trólox a 50 µM.

Para su observación al microscopio confocal, las plantas 35S:BKI-YFP se crecieron durante 5 días en placas verticales, se transfirieron durante 24 horas a placas suplementadas con trolox 50 µM o a medio MS fresco utilizado como control. Cinco horas antes de su observación, las placas se trataron con los compuestos de interés diluidos en MS 0,5x a las concentraciones seleccionadas: 9-KOT 25 µM; 9-HOT 25 µM; epi-brasinólido 10 nM.

Los tratamientos realizados para los análisis de expresión se realizaron en plántulas crecidas en placas con medio MS 0,5x horizontales durante 12 días y sometidas al tratamiento con los compuestos de interés que se añadieron al medio diluidos en MS 0,5x hasta alcanzar las concentraciones seleccionadas: 9-KOT 25 µM; isoxaben 500 nM. El tejido tratado se recogió a los tiempos indicados en cada caso, se congeló en N_2 líquido y se mantuvo a -80° hasta su utilización.

3.6 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

3.6.1 Tinción de callosa

La callosa se identificó mediante observación de la fluorescencia inducida por luz ultravioleta en el fluorocromo del azul de anilina. Las raíces se sumergieron en una solución de azul de anilina 0,1 mg/ml (SiroBiosupplies, Australia) durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, se lavaron con agua y se visualizaron al microscopio bajo luz ultravioleta. En el caso de la tinción de hojas maduras, éstas se destiñeron previamente con etanol 100% durante 2 días y se rehidrataron con agua antes de teñir.

La cuantificación de las papilas de callosa y del tamaño de estas se llevó a cabo con el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Para todos los tratamientos, se examinaron al menos 15 muestras en tres experimentos independientes.

3.6.2 Tinción de lignina

Para la tinción y visualización de lignina, las plántulas se sumergieron en una solución de floroglucinol-HCl al 2% durante 10 minutos, se lavaron y se montaron en agua para su visualización en el microscopio con luz visible.

3.6.3 Captura de imágenes

Las imágenes de raíces fueron tomadas con una cámara digital Olympus DP70 montada sobre un microscopio Leica DMR.

Las imágenes de hojas fueron tomadas con una cámara digital monocroma OrcaR2 (Hamamatsu) sobre un microscopio epifluorescencia Leica DMI 6000B (Leica Microsystems).

Las imágenes de YFP fueron tomadas con un microscopio confocal Leica TC5-SP5 acoplado a un software LAS AF v.2.6.0 y usando un objetivo de inmersión en agua 63x/1.2NA. Para visualizar la fluorescencia se escaneó con Argon 488 nm.

3.7 ANÁLISIS DE PARED CELULAR

Para el análisis de los componentes de pared celular, se utilizaron plántulas de 15 días crecidas en placas horizontales, transferidas a oscuridad para reducir los niveles de almidón antes de su análisis. Los residuos insolubles en alcohol (AIR) se obtuvieron a partir de 150mg de tejido que se congela en nitrógeno líquido, antes de proceder a la extracción utilizando 1 ml de etanol 70% y tres extracciones con 1ml de cloroformo:metanol (1:1, v/v). El pellet se lavó con 1 ml de acetona y se dejó secando al vacío durante una noche. Los análisis de celulosa se realizaron en base al método descrito

por Saeman y col., (1954) y modificado posteriormente por Bauer e Ibáñez (2014, en prensa). El contenido de celulosa se determinó extrayendo la glucosa hemicelulósica, mediante hidrólisis con ácido sulfúrico al 4% a partir de la glucosa total. Para cada muestra se prepararon dos alícuotas de 1 mg conteniendo los residuos insolubles. La primera muestra se trató con 50 µl de ácido sulfúrico al 72% a temperatura ambiente durante una hora, para romper la estructura de la celulosa cristalina. La muestra se diluyó hasta un 4% de ácido sulfúrico, y se calentó a 121°C durante una hora. La segunda alícuota se trató con 1,45 ml de ácido sulfúrico al 4%, para después calentarla a 121° durante una hora. Después de enfriarlas a temperatura ambiente, las reacciones se agitaron con vortex, y se usaron a la dilución 1:50 para el análisis cromatográfico por HPLC.

Los monosacáridos liberados se analizaron usando un sistema de HPLC ICS-3000 (Thermo Fisher Scientific) equipado con un detector de pulsos amperométrico (PAD). Las muestras se inyectaron en una columna de 150mm x 3mm CarboPac PA20 (Thermo Fisher Scientific) con una columna guarda de 50 mmx 3 mm del mismo material, y se eluyeron a 30°C con hidróxido de potasio 2 mM a una velocidad de 0,4 ml/minuto. El contenido de celulosa (mg de celulosa/mg de peso seco) se calculó restando la cantidad de glucosa liberada en la hidrólisis con sulfúrico 4% de la cantidad de glucosa liberada por el tratamiento con ácido sulfúrico al 72%. Para los análisis de azúcares neutros y ácidos urónicos, se hidrolizó una alícuota de 1 mg de AIR con 1,45 ml de ácido sulfúrico al 4%, y la mezcla se calentó a 121 °C durante una hora. Las muestras se enfriaron y vortexearon, y se usó una dilución 1:50 para los análisis de HPLC, tal como ya hemos descrito.

3.8 VECTORES DE TRANSFORMACIÓN

Para la transformación del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* se utilizó el vector pPK2, con resistencia a higromicina, en el que se clonó la construcción GPD:GFP bajo el control del promotor de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa que confiere expresión constitutiva a la proteína verde fluorescente en *Fusarium*.

3.9 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.9.1 Preparación de ARN total de plantas

El ARN total de las plantas se obtuvo a partir de plántulas mediante la precipitación con ácido acético 1M y etanol 100% según el protocolo descrito por (Logemann y col., 1987) y se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nM (DO = 1 equivale a 40 mg/ml). El ARN extraído se analizó por electroforesis y tinción con BrEt, conservándose a -20°C hasta su utilización.

3.9.2 PCR cuantitativa

La expresión génica en las distintas condiciones y tratamientos analizados, se cuantificó mediante ensayos de PCR cuantitativa eliminando la presencia de ADN de las muestras examinadas mediante el uso del kit DNase TURBO DNA-free (Ambion). Se utilizó 1 µg de ARN para sintetizar el ADNc mediante el uso del kit Transcription First Stand cDNA synthesis kit (Roche). La expresión se cuantificó mediante el uso del kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) system (Roche), en todos los casos según las especificaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystem) y los resultados fueron procesados mediante el programa 7500 Software v2.0.5 (Applied Biosystem). Los genes analizados y los cebadores utilizados se muestran en la tabla adjunto. La expresión del gen *RPL3A* (At1g43170), se utilizó como control interno para la cuantificación de transcritos.

Tabla 1. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa		
Gen	Locus	Secuencia de los cebadores
<i>ABC</i>	At1g15520	5' TCCTTAAGTCTCGTGGGTTCTTAC 3' 5' TTGAGGCTTTCCAAGGAGT 3'
<i>FOX</i>	At1g26380	5' AATGCCTTCGGTATCAGGCT 3' 5' GGGTTCGAGAACCTCGTGTT 3'
<i>LOX1</i>	At1g55020	5' TTTGGATGGACTCACTGTTGAAG 3' 5' GTCCAAGTATGGCATCAGTGT 3'
<i>LOX5</i>	At3g22400	5' GGCTTGGAGGACTGACGAA 3' 5' TTTGCAGAGTCCAGACAGCTC 3'
<i>RPL3A</i>	At1g43170	5' GTCTCACAGGAAGTTTGAGCACC 3' 5' CCTTAGGGAACGCCTTCACC 3'

3.10 ANÁLISIS DE PERFILES TRANSCRIPTÓMICOS

Se analizaron y compararon los perfiles transcriptómicos de plántulas a los 12 días según se describe a continuación: i) plántulas silvestres sin tratar vs. plántulas *noxy2-2* sin tratar, ii) plántulas silvestres vs. plántulas *noxy2-2*, tratadas con isoxaben durante 9h.

Las muestras de ARN se purificaron con el kit “RNAeasy mini kit” (Quiagen) y se cuantificaron con un Nanodrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (Nanodrop Technology Inc.). La calidad del ARN se verificó mediante el uso de un bioanalyzer Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). Para cada tratamiento se prepararon 3 réplicas biológicas de ARN y se hibridaron independientemente utilizando micromatrices 100718:Athla_TAIR9_exp_H12 genome array (NimbleGen Gene Expression 12x135K platform, Roche). Cada micromatriz se hibridó con el kit de hibridación NimbleGen y se lavó con la solución de lavado NimbleGen (ambos de Roche). Las micromatrices se examinaron utilizando un escáner de ADN de micromatrices (Agilent Technologies) a una

resolución de 16 bits y los datos se analizaron utilizando el programa NimbleGen Scan, de Roche. Los transcritos diferencialmente expresados se determinaron mediante el uso del programa Limma (Smyth y col., 2005) y para controlar la tasa de falsos positivos los valores P se corrigieron usando el método descrito por (Benjamini y Hochberg, 1995).

Los grupos de genes diferencialmente expresados se identificaron usando el programa Multiexperiment Viewer (MeV) v.4.3 (www.tm4.org) empleando un método de agrupación de media K y la correlación de Pearson's.

Para realizar las comparaciones transcriptómicas, se hizo uso de la aplicación FatiGO (Al-Shahrour y col., 2004), contenida en la suite online Babelomics vs.3.2 (Al-Shahrour y col., 2006). Para realizar el análisis funcional de los genes diferencialmente expresados se utilizó el servidor del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 PARTICIPACIÓN DE LOS GENES 9-LOX EN LA SEÑALIZACIÓN DEL DAÑO EN LA PARED CELULAR

Estudios previos realizados en el laboratorio habían puesto de manifiesto la participación de las enzimas 9-lipooxigenasas (9-LOX) en la respuesta de defensa vegetal y que la acción defensiva de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT, generadas a través de esta ruta, se ejerce mediante la producción de estrés oxidativo, la modificación de la pared celular y la alteración de la expresión de genes específicos de la planta. Además, la caracterización de plantas mutantes de *Arabidopsis* insensibles a 9-HOT (*noxy* del inglés, *non-responding to oxylipins*) mostró que las deficiencias en la ruta de señalización regulada por la acción de las 9-oxilipinas estaban, con frecuencia, asociadas a un defecto en la respuesta de la planta al daño en la pared celular. Estos resultados sugerían que las enzimas 9-LOX podrían formar parte de la denominada ruta de la integridad de la pared celular que se activa en respuesta al daño causado durante la infección y cuya activación contribuye a limitar el crecimiento y el progreso del patógeno en la planta (Vellosillo y col., 2007; Vellosillo y col., 2013).

En el presente trabajo hemos continuado estos estudios, procediendo a examinar el papel de las enzimas 9-LOX en la respuesta al daño en la pared celular de la planta, así como los procesos de señalización regulados por la acción las 9-oxilipinas en esta respuesta.

4.1.1 Las enzimas 9-lipooxigenasas regulan la respuesta al daño en la pared celular

Para examinar el papel de las enzimas 9-lipooxigenasas en la señalización del daño de la pared celular, procedimos a evaluar la respuesta de plantas silvestres y plantas mutantes *lox1lox5*, carentes de actividad 9-LOX, al tratamiento con isoxaben, un herbicida que inhibe la actividad de las enzimas celulosa sintasa provocando la reducción de los niveles de celulosa y la parada del crecimiento de la planta (Heim y col., 1990a; Scheible y col., 2001; Caño-Delgado y col., 2003). La respuesta a este herbicida está acompañada de la formación de depósitos de lignina, así como de una amplia reprogramación transcripcional en genes de la planta implicados en procesos de defensa, de estrés oxidativo y de modificación de la pared celular (Huckelhoven, 2007; Bhuiyan y col., 2009a, 2009b). Además, otros estudios han demostrado que la mutación de los genes que codifican las enzimas celulosa sintasa conlleva la activación de genes y rutas de defensa y el aumento de la resistencia de la planta frente a la infección de patógenos tales como *Plectosphaerella cucumerina* y

Ralstonia solanacearum (Ellis y Turner, 2001; Caño-Delgado y col., 2003; Hernandez-Blanco y col., 2007). Todo lo anterior indica que las respuestas de la planta al isoxaben no están dirigidas simplemente a compensar la reducción de los niveles de celulosa, si no que constituyen una respuesta activa frente al daño y comparten procesos de señalización con la ruta de integridad de la pared celular y la inmunidad vegetal.

Los resultados descritos nos condujeron a iniciar el presente trabajo, dirigido a examinar la participación de las enzimas 9-lipoxigenasas en la señalización que se activa en respuesta al daño en la pared celular provocado por la acción del isoxaben.

Para abordar este estudio procedimos, en primer lugar, a comparar los fenotipos de plantas silvestres y del mutante *lox1lox5* crecidas en medio suplementado con isoxaben. Los resultados de estos análisis no permitían observar diferencias en el crecimiento radicular de las plantas examinadas durante los primeros días de crecimiento en presencia del herbicida (4 días con isoxaben 10nM; Figura 1A); sin embargo, a los 7 días de crecimiento en medio suplementado con isoxaben se observa una detención de crecimiento más pronunciada en el mutante *lox1lox5* que en las plantas silvestres (Figura 1B), siendo las raíces del mutante un 33% más cortas que las de las plantas control. Estos resultados ponen de manifiesto la susceptibilidad del mutante *lox1lox5* al isoxaben y sugieren la participación de las enzimas 9-LOXs en la señalización del daño en la pared celular producido por el herbicida.

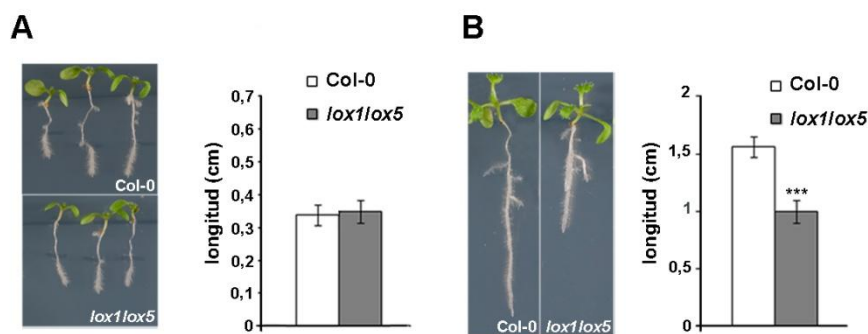


Figura 1. Análisis fenotípico de la respuesta a isoxaben.

A) Fenotipo de plantas del tipo silvestre y del mutante *lox1lox5* crecidas durante tres días en medio MS y posteriormente transferidas durante cuatro días a medio MS con isoxaben (10nM). La gráfica muestra la longitud de crecimiento de las raíces de ambos genotipos desde el momento de su transferencia.

B) Fenotipo del tipo silvestre y del mutante *lox1lox5* crecidas durante tres días en medio MS y posteriormente transferidas durante siete días a medio MS con isoxaben (10nM). La gráfica muestra la longitud de crecimiento de las raíces de ambos genotipos desde el momento de su transferencia. Los datos muestran el valor medio y la desviación estándar obtenidas de la medida de 20 plántulas. Los asteriscos sobre las barras muestran diferencias estadísticamente significativas entre Col-0 y *lox1lox5* (test t de Student; *** p < 0,001). Los datos son el resultado de tres experimentos independientes.

Para confirmar estos resultados decidimos examinar si la adición de oxilipinas sintetizadas por la ruta de las 9-LOXs producía alguna alteración en el fenotipo causado por el isoxaben. Para ello, plantas sanas germinadas en MS se transfirieron a medio

suplementado con isoxaben (10nM), solo o en combinación con 9-KOT o 9-HOT, dos oxilipinas producidas por la ruta de las 9-LOXs que se acumulan en las raíces de plantas silvestres (Vellosillo y col., 2007; Vicente y col., 2012). Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto que la presencia de 9-KOT en el medio causa una clara reversión del acortamiento radicular en los dos genotipos analizados (de 0,3 a 0,8 cm en Col-0 y de 0,3 a 0,6 cm en *lox1lox5*) mientras que el 9-HOT causa una reversión menor, aunque significativa, en las plantas silvestres (Figura 2A). La reversión observada apoya la participación de la ruta de las 9-LOXs y sus derivados en la señalización del daño en la pared celular, en donde la acción de las oxilipinas contribuiría a la recuperación del daño celular.

La participación de las enzimas 9-lipoxigenasa en la respuesta al isoxaben se examinó igualmente mediante el análisis de la expresión de los genes *LOX1* y *LOX5*, que codifican las enzimas 9-LOXs en plantas de *Arabidopsis* (Bannenberg y col., 2009a). Estos ensayos pusieron de manifiesto el aumento de la expresión del gen *LOX1* a las 24 y 48 horas de tratamiento, mientras que el nivel de transcritos correspondientes al gen *LOX5* no mostraba modificaciones importantes (Figura 2B). Los resultados descritos sostienen la participación de la ruta de las 9-LOXs en la señalización del daño en la pared celular en respuesta a isoxaben.

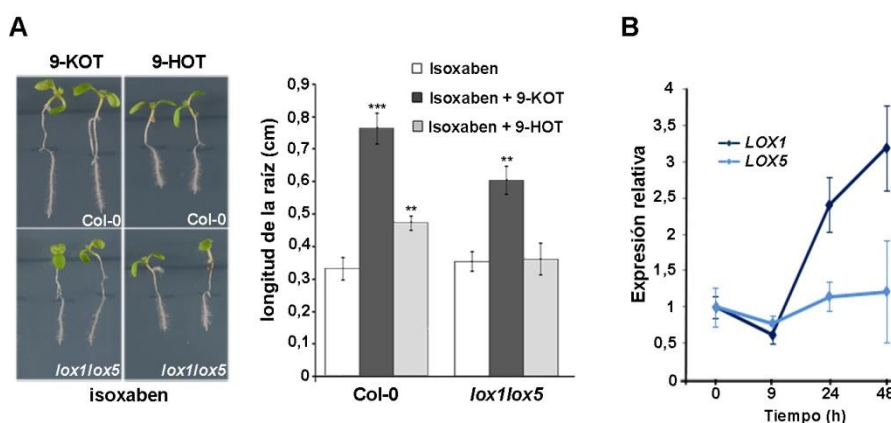


Figura 2. Acción del 9-KOT y el 9-HOT en las respuestas de plántulas silvestres y del mutante *lox1lox5* a isoxaben.

A) Fenotipo de plantas silvestres y del mutante *lox1lox5* crecidas durante tres días en medio MS y transferidas durante cuatro días a medio MS suplementado con isoxaben (10 nM) y 9-KOT (25 μ M) o 9-HOT (25 μ M). La gráfica muestra la longitud de crecimiento de las raíces de ambos genotipos desde el momento de su transferencia. Los datos muestran el valor medio y la desviación estándar obtenidas de la medida de 20 plántulas y son el resultado de tres experimentos independientes. Los asteriscos sobre las barras muestran diferencias estadísticamente significativas entre plántulas crecidas en isoxaben solo o en combinación con 9-KOT o 9-HOT (test t de Student; *** p < 0,001; ** p < 0,01)

B) La expresión de los genes *LOX1* y *LOX5* se determinó mediante un análisis de RT-PCR cuantitativa, a partir de muestras de ARN de plántulas tratadas con isoxaben (500nM) y recogidas a diferentes tiempos. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se usó el gen *At1g43170*, que codifica la proteína RPL3A. Los resultados son la media \pm DE de tres experimentos independientes.

4.1.2 Las oxilipinas derivadas de las rutas de las 9-LOXs y 13-LOXs revierten el fenotipo inducido por el isoxaben

Trabajos anteriores dirigidos a examinar la función de las oxilipinas, revelaron que tanto el 9-HOT como el 9-KOT, así como otras ocho oxilipinas (sintetizadas a través de las rutas iniciadas por la acción de las 9-LOX, 13-LOX y α -DOX, descritas en la Tabla 1) inducen el rizo radicular en plántulas silvestres de *Arabidopsis*.

Tabla 2. Actividad fenotípica de las oxilipinas usadas en este estudio

Oxilipinas	Nombre corto
Rizo radicular	
Ácido 9(S)-Hidroxi-10(E), 12(Z), 15(Z)-octadecatrienoico	9-HOT
Ácido 9(S)-Hidroxi-10(E), 12(Z)-octadecadienoico	9-HOD
Ácido 9(S)-Keto-10(E), 12(Z), 15(Z)-octadecatrienoico	9-KOT
Ácido 9(S)-Keto-10(E), 12(Z)-octadecadienoico	9-KOD
Ácido 9-Hidroxi-10-oxo-12(Z)-octadecenoico	9,10-KHOE
Ácido 13(S)-Hidroxi-9(Z), 11(E), 15(Z)-octadecatrienoico	13-HOT
Ácido 13(S)-Hidroxi-9(Z), 11(E)-octadecadienoico	13-HOD
Ácido 13-Oxo-9(Z), 11(E)-octadecadienoico	13-KOD
Ácido 13-Hidroxi-12-oxo-9(Z), 15(Z)-octadecadienoico	12, 13-KHOD
Ácido 2 (R, S)-Hidroxi-9(Z)-octadecenoico	2-HOE
Parada de crecimiento radicular con pérdida de dominancia apical	
Ácido 9-oxononanoico	9-Oxo-C ₉
Parada de crecimiento generalizada	
Ácido 12-Oxo-10, 15(Z)-fitodienoico	OPDA
Ácido 3-Oxo-2-(2Z)-2-pentenil-ciclopentaneacético	JA

Por ello, decidimos examinar si, además del 9-HOT y el 9-KOT, otras oxilipinas inductoras del rizo radicular podrían interferir la acción del isoxaben. Además, quisimos estudiar si oxilipinas que activan rutas de señalización independientes (Vellosillo y col., 2007), como son el 9-oxo-C₉, el OPDA y el Ácido Jasmónico (JA) modificaban la respuesta al herbicida. Como se muestra en la Figura 3, en estos análisis pudimos comprobar que la aplicación de las oxilipinas 9,10-KHOE, 12,13-KHOD, 9-KOD y 13-KOD revierte el fenotipo del isoxaben de forma significativa, aunque en menor proporción que el 9-KOT (Figura 2), mientras que el resto de oxilipinas examinadas no ejercen ningún efecto en el fenotipo radicular inducido por el isoxaben. Estos resultados muestran la capacidad de las oxilipinas inductoras de rizo radicular, particularmente de aquellas que contienen un grupo cetónico, para revertir el fenotipo causado por el isoxaben y, por tanto, sugieren su participación en los procesos de señalización del daño de la pared celular en las raíces de *Arabidopsis*.

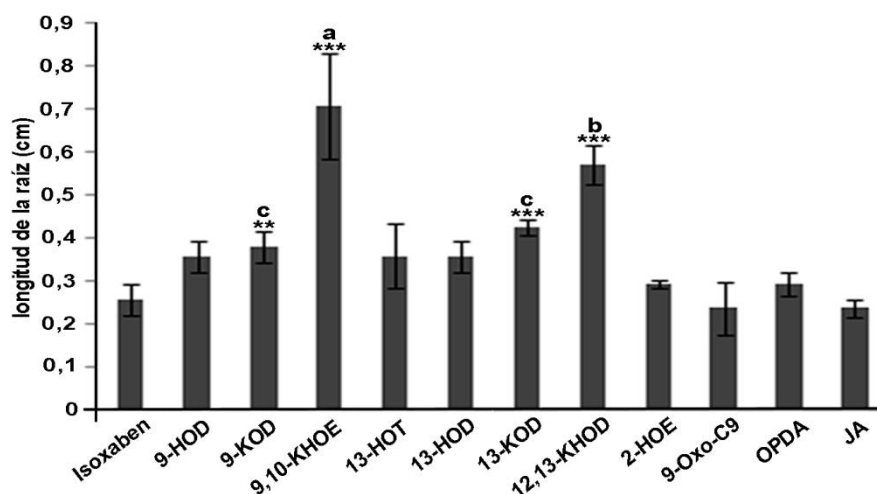


Figura 3. Análisis de la longitud de la raíz en plantas silvestres de *Arabidopsis* crecidas en isoxaben y oxilipinas. Longitud de las raíces principales de plantas Col-0 crecidas durante tres días en medio MS y transferidas cuatro días a medio suplementado con isoxaben 10nM solo o en combinación con las siguientes oxilipinas: 9-HOD, 9-KOD, 9,10-KHOE, 13-HOT, 13-HOD, 13-KOD y 12,13-KHOD (a 25 μ M todas ellas); 2-HOE (75 μ M); 9-oxo-C₉ (15 μ M); OPDA (2 μ M) y JA (10 μ M). Los datos muestran la media \pm la desviación estándar de la longitud de 20 plántulas en tres experimentos independientes. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre plántulas crecidas en isoxaben solo o en combinación con oxilipinas (test t de Student; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$). Se indican las diferencias significativas de reversión entre las distintas oxilipinas (test ANOVA; las letras sobre las barras indican diferencias significativas).

Dada la existencia de estudios previos que relacionaban la participación del ácido jasmónico con la respuesta a isoxaben (Caño-Delgado y col., 2003; Denness y col., 2011), analizamos el fenotipo de los mutantes *aos* (deficientes en la síntesis de JA; (Park y col., 2002)) y *coi1-1* (insensible a JA; (Xie y col., 1998)) en respuesta al herbicida. En estos análisis no se observan diferencias significativas en la respuesta al isoxaben de las plantas silvestres y de los mutantes examinados, y permiten descartar la participación del ácido JA en la aparición del fenotipo radicular examinado (Figura 4).



Figura 4. Análisis fenotípico de la respuesta a isoxaben de mutantes de jasmónico. Fenotipo del tipo silvestre y de los mutantes *coi1-1* y *aos* crecidas durante tres días en medio MS y posteriormente transferidas durante cuatro días a medio MS con isoxaben (10nM). Se muestran imágenes representativas del análisis de 15 plantas en tres experimentos independientes.

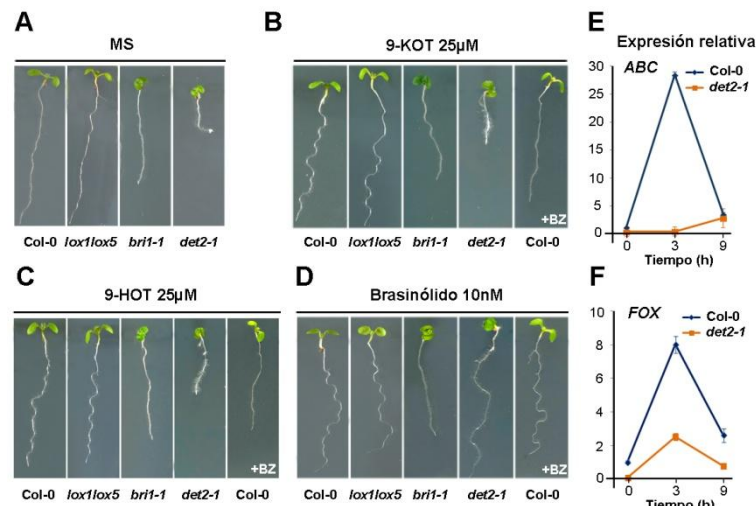
4.1.3 La aplicación de las oxilipinas 9-KOT y 9-HOT induce la síntesis de brasinoesteroides

Los resultados descritos apoyan la participación de las enzimas lipooxigenasas en la señalización del daño celular y ponen de manifiesto el papel de las oxilipinas 9-KOT y 9-HOT en la regulación de esta respuesta. Estas características muestran un claro

paralelismo con las asignadas al 24-epi-brasinólido (BL), uno de los brasinoesteroides más activos, que actúa como señal en la reparación del daño de la pared celular e induce un fenotipo de rizo radicular (Lanza y col., 2012; Wolf y col., 2012) similar al provocado por las oxilipinas. Esta coincidencia indicaba que las rutas de transducción reguladas por 9-KOT, 9-HOT y BL podrían compartir procesos de señalización.

Para analizar esta posibilidad procedimos a examinar la respuesta de plantas silvestres, de mutantes deficientes en la síntesis de oxilipinas (*lox1lox5*; carentes de actividad 9-LOX) y de los mutantes *bri1-1* (deficientes en la percepción de BRs) y *det2-1* (deficiente en la síntesis de BRs) a las señales de interés. Los resultados de estos análisis permitieron comprobar que el tratamiento con 9-KOT y 9-HOT induce el rizo radicular en plantas silvestres y en el mutante *lox1lox5*, pero no en los mutantes *bri1-1* ni *det2-1* (Figura 5). Por otra parte, el crecimiento en placas suplementadas con BL induce el rizo en plántulas silvestres y en el mutante *lox1lox5*, pero no en *bri1-1*, incapaz de percibir BL (Figura 5C). A diferencia de lo que ocurre con el mutante *bri1-1*, el mutante *det2-1*, deficiente en la síntesis de BRs, responde a la aplicación de BL induciendo rizo radicular. Estos resultados indicaban que el fenotipo de rizo radicular provocado en respuesta a la aplicación de 9-KOT y 9-HOT se produciría como consecuencia de la activación de la síntesis de BRs y de la ruta de señalización regulada por esta hormona. Para confirmar estos resultados procedimos a utilizar el inhibidor de la síntesis de brasinoesteroides, brasinazol (BZ), y a examinar los fenotipos de rizo radicular inducidos por la acción de BL, 9-HOT y 9-KOT al aplicarlos conjuntamente con este inhibidor. De acuerdo a nuestras expectativas, la aplicación de BZ, y por tanto la inhibición de la síntesis de BRs, inhibe la respuesta de rizo radicular inducida por las oxilipinas 9-KOT/9-HOT (Figura 5B), mientras que el BZ no afecta al fenotipo de rizo radicular que se induce en respuesta a la aplicación de BL (Figura 5C), demostrando así que el rizo provocado por 9-HOT y el 9-KOT se establece mediante la inducción de la síntesis de brasinoesteroides.

Los análisis fenotípicos descritos se acompañaron del estudio de la expresión de los genes *ABC* y *FOX*, marcadores de respuesta al 9-KOT y 9-HOT (Lopez y col., 2011; Vicente y col., 2012) en plantas silvestres y en el mutante *det2-1* tras el tratamiento con 9-KOT. Los resultados de estos análisis permitieron comprobar que la expresión de ambos genes se induce en las plantas silvestres a las tres horas del tratamiento con 9-KOT, mientras que dicha activación está seriamente comprometida en el mutante *det2-1*, en donde solo se alcanza una pequeña inducción de la expresión. Estos análisis apoyan los resultados que ponen de manifiesto la activación de la síntesis de BRs en respuesta a la aplicación de 9-KOT.



La insensibilidad del mutante *bri1-1* a la aplicación de 9-KOT y 9-HOT, permitía suponer que la activación de la respuesta de rizo radicular inducida por otras oxilipinas requeriría, igualmente, la participación de la ruta de señalización regulada por los BRs. Para examinar esta posibilidad procedimos a analizar la respuesta del mutante *bri1-1*, al tratamiento con el resto de las oxilipinas inductoras del rizo radicular (Vellosillo y col., 2007). De acuerdo a lo esperado, las oxilipinas analizadas no activan una respuesta de rizo radicular en el mutante *bri1-1*, demostrando que este fenotipo se establece a través de la señalización de los BRS.

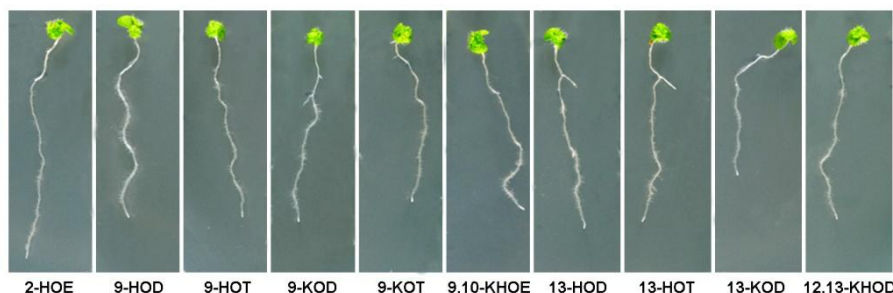


Figura 6. Análisis fenotípico del mutante *bri1-1* crecido en presencia de oxilipinas. Fenotipo del mutante *bri1-1*, crecido durante 3 días en MS y transferido durante 4 días a medio MS suplementado con oxilipinas, para su posterior observación. La concentración de las oxilipinas utilizada fue 25µM, exceptuando el 2-HOE, del que se utilizó una concentración 75µM.

4.1.4 El efecto del 9-KOT en la respuesta al isoxaben se establece a través de la señalización de los BRs

En base a los resultados que demuestran la participación de los BRs en la respuesta de rizo radicular inducida por las oxilipinas, quisimos analizar si la activación de los BRs también mediaba la reversión del fenotipo del isoxaben causada por el 9-KOT. Para ello, procedimos a examinar la respuesta de los mutantes *det2-1* y *bri1-1* a la aplicación conjunta de isoxaben y 9-KOT. Los resultados de estos análisis permitieron comprobar que el defecto en la síntesis y en la señalización de BRs de estos mutantes provoca un mayor acortamiento de la raíz tras el tratamiento con isoxaben que el observado en las plantas silvestres y que, además, la aplicación de 9-KOT no revierte este fenotipo. Estos resultados permiten concluir que la acción del 9-KOT en la reversión del acortamiento radicular producido por el isoxaben se establece a través de la síntesis y de la señalización de brasinoesteroides.

Los análisis fenotípicos descritos se acompañaron del estudio de la expresión de los genes *ABC* y *FOX*, marcadores de respuesta al 9-KOT y 9-HOT, en plantas silvestres y en el mutante *det2-1* tras el tratamiento con isoxaben. Los resultados de estos análisis mostraron que la expresión de ambos genes se induce en las plantas silvestres tras el tratamiento con isoxaben, mientras que dicha activación está seriamente comprometida en el mutante *det2-1*, en donde solo se alcanza una pequeña inducción de la expresión. Estos resultados apoyan el papel de las oxilipinas en la respuesta a isoxaben y la participación de los BRs en la respuesta a 9-KOT y al herbicida.

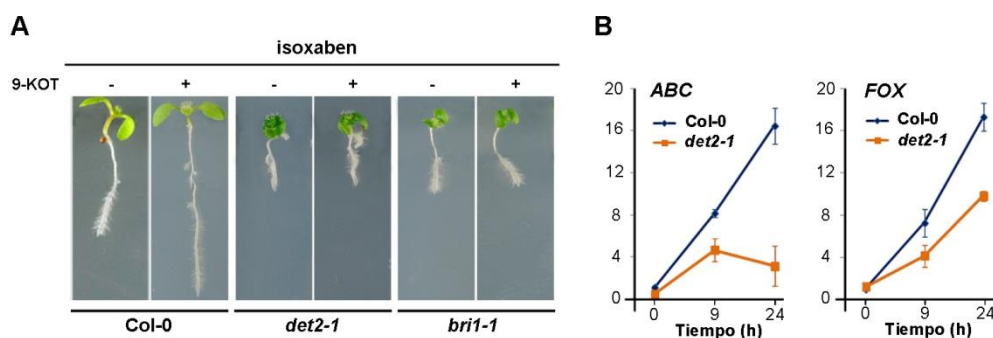


Figura 7. Respuesta de plántulas silvestres, *bri1-1* y *det2-1* a 9-KOT y BL.

A) Fenotipo de plántulas crecidas durante 3 días en medio MS y posteriormente transferidas por 4 días a medio MS suplementado con isoxaben (10nM) solo o con 9-KOT (25 μ M).

B) Análisis de expresión de los genes *ABC* y *FOX* mediante qRT-PCR a partir de ARN de plantas Col-0 y *det2-1* tratadas con isoxaben 500 nM. Como control interno para normalizar el nivel de transcritos, se usó el gen At1g43170, que codifica la proteína RPL3A. Los resultados son la media \pm DE de tres experimentos independientes.

4.1.5 Las oxilipinas 9-KOT y 9-HOT activan la ruta de señalización regulada por los BRs

Como continuación de los resultados descritos, nos propusimos examinar si la aplicación de 9-KOT y 9-HOT activa la ruta de señalización regulada por los BRs. Para ello, hicimos uso de la línea transgénica BKI1:YFP, marcadora de la señalización de brasinoesteroides. La proteína BKI1 (del inglés BRASSINOESTERIOD KINASE INHIBITOR1) se localiza en la membrana plasmática, en donde interacciona con el receptor de brasinoesteroides BRI1 inhibiendo la señalización de esta ruta; en respuesta a la presencia de BRs, la proteína BKI1 se traslada al citosol y permite la activación de la señalización (X. Wang y Chory, 2006). De acuerdo a estas características, la fluorescencia que se observa en la raíz de las plantas transgénicas BKI1:YFP no tratadas está preferentemente localizada en la membrana celular, mientras que a las 5 h del tratamiento con BL la fluorescencia se encuentra mayoritariamente localizada en el citoplasma celular (Figura 8). De la misma manera, la aplicación de 9-KOT o 9-HOT provoca la relocalización de la proteína BKI1:YFP desde la membrana al citoplasma, contribuyendo así a la activación de la ruta de señalización regulada por los BRs.

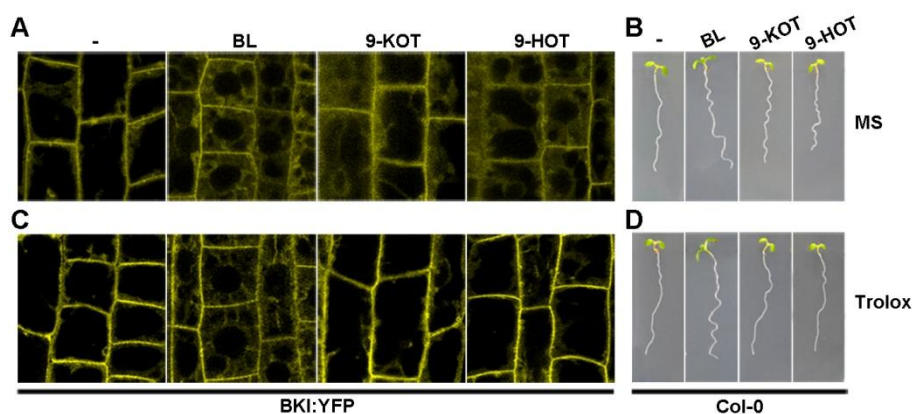


Figura 8. Localización espacial de la proteína BKI:YFP en plantas transgénicas en respuesta al tratamiento por oxilipinas y BL.

A) Imágenes de microscopía confocal de raíces de plántulas 35S:BKI:YFP crecidas durante 6 días en medio MS, a las 5 horas de tratamiento con BL 10nM, 9KOT 25μM o 9-HOT 25μM.

B) Fenotipo de las plantas silvestres crecidas durante 3 días en MS y trasferidas para su crecimiento durante 4 días en medio MS suplementado con BL 10nM, 9KOT 25μM o 9-HOT 25μM.

C) Imágenes de microscopía confocal de raíces de plántulas 35S:BKI:YFP crecidas durante 5 días en medio MS, transferidas 24 horas a medio MS suplementado con trolox 50 μM y posteriormente tratadas durante 5 horas con BL 10nM, 9KOT 25μM o 9-HOT 25μM.

D) Fenotipo de las plantas silvestres crecidas durante 3 días en MS y trasferidas para su crecimiento durante 4 días en medio MS suplementado con trólox (50 μM) junto con BL 10nM, 9KOT 25μM o 9-HOT 25μM.

Los datos que indican que la aplicación de 9-KOT conduce a la activación de la respuesta a brasinoesteroides se sustentan, además, por los resultados obtenidos mediante la comparación de los perfiles transcriptómicos de la respuesta a 9-KOT (Vicente et al., 2012) con un compendio de genes de respuesta a BRs (Sun y col., 2010). La comparación de

ambos perfiles transcriptómicos permite observar que el grupo de transcritos inducidos por 9-KOT se encuentra significativamente enriquecido en genes de respuesta a BRs, tanto inducidos (24%) como reprimidos (12%).

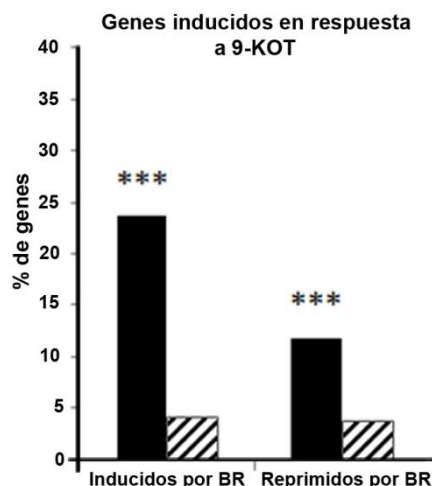


Figura 9. Comparación de los análisis transcriptómicos de respuesta a 9-KOT y a BR. Las barras negras muestran los genes coincidentes en ambas respuestas, mientras que las barras rayadas muestran el umbral de coincidencia al azar. Los asteriscos encima de la barra indican diferencias estadísticamente significativas mediante un test binomial *** $p < 0,001$. Los genes anteriormente descritos como inducibles en respuesta a 9-KOT (Vicente y col., 2012) se compararon con un compendio de genes de respuesta a brasinoesteroides, procedentes de distintos estudios de micromatrices (Sun y col., 2010)

4.1.6 La actividad antioxidante de los tocoferoles inhibe la acción de las oxilipinas como inductoras de la señalización de BRs

Estudios previos de nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto que el fenotipo de rizo radicular inducido por 9-HOT se inhibe en presencia de trolox, un análogo del α -tocopherol con actividad antioxidante que limita la peroxidación de lípidos (Lopez y col., 2011). En base a estos resultados, y dado que el rizo radicular inducido por 9-KOT y 9-HOT se establece a través de la activación de la señalización de BRs, nos propusimos examinar si la aplicación de trolox podría interferir la acción del 9-KOT y 9-HOT como inductores de la señalización de BRs, y si este agente antioxidante podría inhibir también el rizo radicular activado por los BRs.

Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto que, mientras que el trolox inhibe el rizo producido por el 9-KOT y el 9-HOT, su presencia no impide la activación del rizo radicular inducido en respuesta a la aplicación de BL (Figura 8B y 8D). De esta manera, nuestros resultados indicarían que la actividad protectora del trolox sobre los lípidos impediría la acción de las oxilipinas como activadoras de los brasinoesteroides. Para examinar esta posibilidad, procedimos a analizar la localización de la proteína BK1:YFP en raíces de plantas crecidas durante 24 horas en presencia de trolox y tratadas posteriormente con 9-HOT, 9-KOT o BL (Figura 8C). En estos análisis pudimos observar que el tratamiento con trolox provocaba un aumento en la fluorescencia de la membrana y, por tanto, la retención de la proteína BK1:YFP en la membrana plasmática. En estas

condiciones, la aplicación de BL favorece la relocalización de BKI1:YFP de la membrana al citoplasma y, como consecuencia, la activación de la señalización en respuesta a esta hormona; por el contrario, la aplicación de 9-HOT o 9-KOT, no produce la relocalización de la proteína BKI1:YFP, que permanece prioritariamente localizada en la membrana plasmática (Figura 8C). Estos resultados permiten concluir que la aplicación de trolox interfiere con la acción del 9-KOT y 9-HOT como activadores de la señalización de los BRs y, por tanto, que el 9-HOT y el 9-KOT activarían la síntesis de BRs mediante la producción de estrés oxidativo y peroxidación de lípidos.

4.1.7 Las modificaciones de pared celular inducidas por las 9-lipooxigenasas se establecen mediante la señalización de los brasinoesteroides

Estudios previos realizados en el laboratorio habían puesto de manifiesto que la aplicación de 9-HOT provoca la deposición de acúmulos de calosa en la pared celular (Vellosillo y col., 2007). Por ello, y dado que los resultados descritos anteriormente indican que la respuesta a estas señales lipídicas se induce a través de la activación de la ruta de los BRs, procedimos a examinar si la producción de acúmulos de calosa activada por las oxilipinas se establece, igualmente, a través de la señalización de los BRs. Para evaluar esta posibilidad examinamos la formación de calosa en plantas silvestres de *Arabidopsis* y en plantas mutantes *bri1-1* y *det2-1* (deficientes en la percepción y la síntesis de BRs, respectivamente) sometidas al tratamiento con 9-HOT. Como se muestra en la Figura 10, el crecimiento de las plantas en medio MS suplementado con 9-HOT (25 μ M) produce la acumulación de abundantes depósitos de calosa en las raíces de las plantas silvestres, mientras que dicha respuesta no se observa en los mutantes *bri1-1* y *det2-1*. De acuerdo a estos resultados que reflejan la participación de los BRs en la respuesta al 9-HOT, la aplicación del inhibidor de la síntesis de BRs, BZ, impide la formación de depósitos de calosa cuando se aplica conjuntamente con el 9-HOT.

En concordancia con estos resultados, observamos que el tratamiento conjunto con BL y 9-HOT en el mutante *det2-1* induce la formación de depósitos de calosa, mientras que el mutante *bri1-1* no activa esta respuesta. Finalmente, y como control de estos experimentos, pudimos observar que el tratamiento con BZ o BL no induce la formación de calosa en ninguno de las plantas examinadas. Todos estos resultados contribuyen a demostrar que la formación de depósitos de calosa en respuesta al tratamiento con 9-HOT se establece mediante la activación de la síntesis y la señalización de BRs y que ambas señales, las 9-oxilipinas y los BRs, actúan de forma secuencial para inducir la modificación de la pared celular.

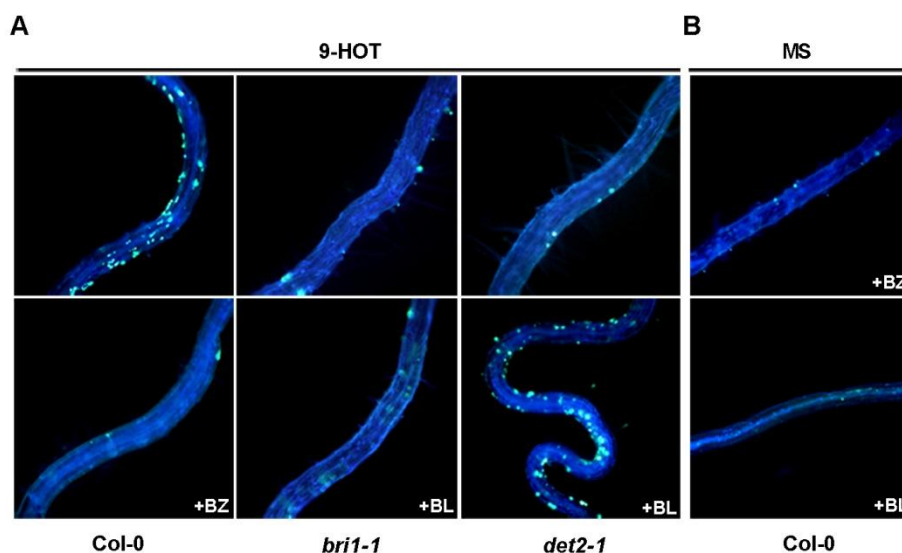


Figura 10. Formación de depósitos de calosa en las raíces de plántulas silvestres y mutantes tras el tratamiento con isoxaben.

A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de la deposición de calosa tras la tinción con azul de anilina en raíces de plantas silvestres, *bri1-1* y *det2-1* tras su tratamiento con 9-HOT (25 μ M). Las figuras inferiores muestran la deposición de calosa en raíces tratadas con 9-HOT y BZ (1 μ M) o BL (10 nM).

B) Raíces de plántulas silvestres tratadas con BZ (1 μ M) o BZ (10 nM).

4.1.8 La activación de los BRs favorece la modificación de la pared celular durante la defensa de la planta

La formación de depósitos de calosa se activa durante la respuesta de defensa de la planta frente al ataque de patógenos (Vorwerk y col., 2004; Luna y col., 2011) y su aparición contribuye a limitar la infección y la progresión del patógeno en el tejido infectado. Por ello, procedimos a examinar si las enzimas 9-lipooxigenasas y los brasinoesteroides participan en la formación de calosa durante la respuesta de defensa de la planta, seleccionando para realizar estos análisis la bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. El fenotipo enano de los mutantes *det2-1* y *bri1-1* impedía su utilización en este estudio, por lo que procedimos a hacer uso de los mutantes *bzr1-1D* y *bes1-D*, en los que la ruta de los BRs se encuentra activada de forma constitutiva (Y. Yin y col., 2002b; He y col., 2005). Los resultados obtenidos permiten observar que la infección bacteriana provoca la formación de depósitos de calosa en todos los genotipos examinados, es decir, en las plantas silvestres y en los mutantes *lox1lox5* (deficiente en actividad 9-LOX), *bzr1-1D* y *bes1-D* (estos dos últimos con activación constitutiva de BRs). La cuantificación de esta respuesta no reveló diferencias significativas en el número de depósitos de calosa formados en los distintos mutantes, mientras que el análisis del tamaño de los acúmulos puso de manifiesto diferencias significativas en el mutante *bes1-D* en el que resultaron ser 2,5 veces mayores que los observados en las plantas silvestres Col-0. De hecho, es en este mutante en el único en que se producen acúmulos de calosa en

respuesta a la inoculación de Cl_2Mg utilizado como control. Estos resultados ponen de manifiesto que la activación de la señalización de los BRs favorece la modificación de la pared celular en respuesta a una infección bacteriana, y posiblemente, la activación de la respuesta de defensa.

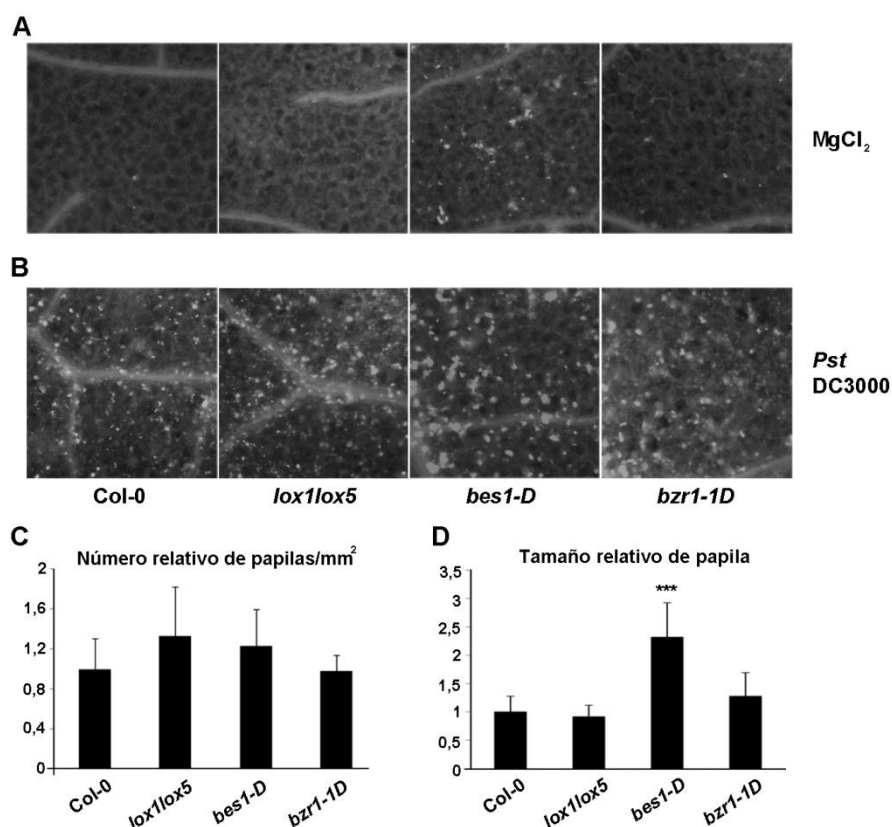


Figura 11. Caracterización de la formación de calosa en hojas tras la infección con *Pst* DC3000.

A) Visualización mediante microscopía de fluorescencia de la deposición de calosa en hojas de Col-0, *lox1lox5*, *bes1-D* y *bzt1-1D* a las 24h tras su infiltración con Cl_2Mg , (10 nM).

B) Visualización mediante microscopía de fluorescencia de la deposición de calosa en hojas de Col-0, *lox1lox5*, *bes1-D* y *bzt1-1D* a las 24h tras su infiltración con *Pst* DC3000 (10^7 ufc/ml).

C) Cuantificación de los depósitos de calosa formados tras la infección bacteriana. El número de acúmulos está expresado en unidades relativas por mm^2 normalizado respecto al valor en plantas silvestres.

D) Tamaño de los depósitos de calosa formados tras la infección bacteriana. Los valores están expresados en unidades relativas, normalizados respecto al tamaño de los depósitos en plantas silvestres. Los asteriscos sobre las barras señalan diferencias estadísticamente significativas entre plántulas silvestres y mutantes (test t de Student, *** $p < 0,001$). Todas las hojas se tiñeron con azul de anilina y fueron examinadas 24 horas tras el tratamiento.

4.1.9 Las modificaciones de pared celular inducidas por el isoxaben se establecen mediante la señalización de los brasinoesteroides

Los resultados que ponen de manifiesto la participación de los brasinoesteroides en la modificación de pared celular inducida por las 9-LOXs, nos condujo a examinar si la ruta de los BRs podría regular la formación de otras modificaciones de pared que pudieran contribuir, igualmente, a la defensa de la planta frente a la infección por patógenos. Una de dichas respuestas es la acumulación de lignina, compuesto que forma parte de la pared

secundaria de las células vegetales y que se acumula de forma ectópica en respuesta al tratamiento con isoxaben (Caño-Delgado y col., 2003).

En plantas control, el tratamiento con isoxaben induce la formación de depósitos de lignina en dos zonas distintas de la raíz, una cercana al ápice y una segunda en la zona de elongación por encima del engrosamiento producido como consecuencia de la parada de crecimiento causada por el isoxaben. A diferencia de estos resultados, en los mutantes *bri1-1* y *det2-1* solo se observa formación de lignina en la zona cercana al ápice radicular, mientras que la zona de elongación aparece libre de depósitos de lignina. El tratamiento conjunto de BL e isoxaben revierte el fenotipo de acumulación de lignina en el mutante *det2-1*, en el que la presencia de ambos compuestos provoca la formación de depósitos de lignina en el ápice y en la zona de elongación de la raíz. Esto no ocurre, sin embargo, en el mutante *bri1-1*, en el que la adición de BL no modifica la respuesta al isoxaben.

Los resultados descritos apoyan la participación de los BRs en la acumulación de lignina en respuesta al daño celular causado por el isoxaben. En línea con estos resultados, se pudo observar que la adición de BZ y de isoxaben en plantas silvestres impide la acumulación de lignina en la zona de elongación de la raíz. El análisis de los mutantes de ganancia de función, *bes1-D* y *bzr1-1D*, en los que la ruta de los BRs se encuentra activada de forma constitutiva, nos mostró un aumento en la acumulación de lignina en la zona de elongación radicular tras el tratamiento con isoxaben, en comparación con las plantas silvestres.

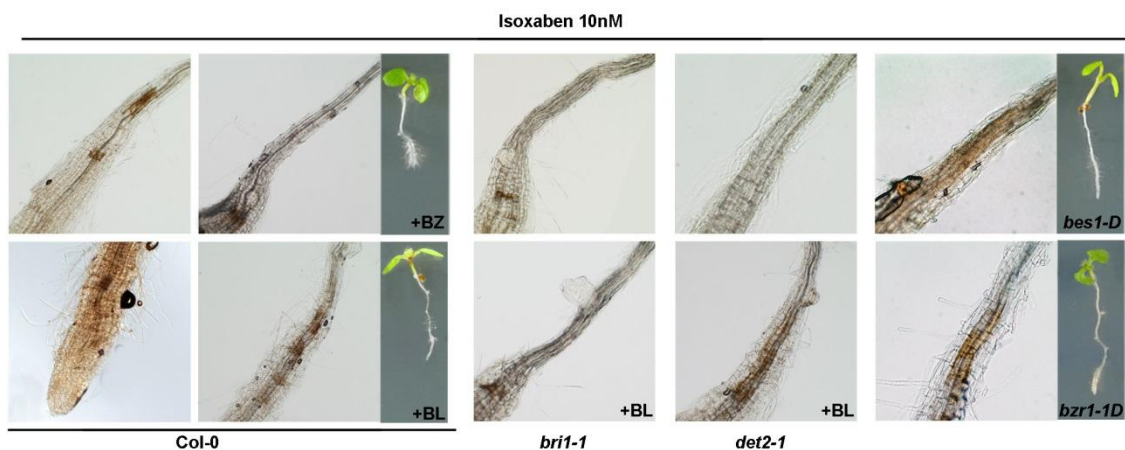


Figura 12. Análisis histológico de los depósitos de lignina tras el tratamiento con isoxaben. Se muestran imágenes de microscopía obtenidas tras la tinción con fluoroglucinol del genotipo silvestre, y los mutantes *bri1-1*, *det2-1*, *bes1-D* y *bzr1-1D* de plantas crecidas durante 4 días en MS y traspasadas a medio con isoxaben 10nM, suplementado en algunos casos con BZ 1μM o BL 10nM, durante 3 días.

El análisis de los fenotipos producidos por el isoxaben permite observar que la activación constitutiva de la señalización de los BRs provoca una reducción del fenotipo de acortamiento inducido por el herbicida; de la misma manera, la aplicación de BL junto con

isoxaben en plantas silvestres provoca una disminución en el engrosamiento radicular producido por el isoxaben en la raíz que, sin embargo, mantiene un nivel de reducción en la longitud similar al observado en ausencia de BL.

4.1.10 La insensibilidad del mutante *noxy2-2* al isoxaben está asociada a un defecto en la percepción del daño en la pared celular

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un aumento en la susceptibilidad del mutante *lox1lox5* (carente de actividad 9-LOX) al isoxaben, en comparación con las plantas silvestres, y la participación de los derivados de las 9-LOXs en la señalización de la respuesta a este herbicida. Estos resultados contrastan con resultados obtenidos en el laboratorio en los que se demostraba que gran parte de los mutantes afectados en la señalización de las 9-LOX (mutantes *noxy*, del inglés *non-responding to oxylipins*) poseen insensibilidad parcial a isoxaben (Vellosillo y col., 2013). Para investigar esta supuesta contradicción se seleccionó el mutante *noxy2-2*, insensible a la aplicación de 9-HOT y parcialmente resistente al isoxaben (Vellosillo y col., 2007; Vellosillo y col., 2013).

La insensibilidad del mutante *noxy2-2* a la presencia de isoxaben (10nM) se concluye de los resultados que muestran una reducción en el engrosamiento y el acortamiento de la raíz con respecto al observado en las plantas silvestres (Figura 13A). Además, el aumento de la concentración de isoxaben provoca un amarilleamiento en las hojas que es igualmente más acusado en las plantas silvestres que en el mutante *noxy2-2* (Figura 13A).

La insensibilidad parcial a isoxaben del mutante *noxy2-2* podría ser consecuencia de un aumento en la capacidad para reparar el daño causado por el isoxaben o, al contrario, a un defecto en capacidad para percibir y responder al daño en la pared celular. Para distinguir entre estas dos posibilidades, procedimos a examinar los perfiles transcriptómicos de plántulas *noxy2-2* y Col-0 sin tratar, y de plántulas tratadas durante 9 horas con isoxaben. Los resultados de estos análisis muestran que, en condiciones basales, en el mutante *noxy2-2* se detectan 55 genes diferencialmente inducidos y 66 diferencialmente reprimidos con respecto al nivel de expresión correspondiente a las plantas silvestres (diferencias de dos veces o más, con un FDR<0,05). Los genes alterados en el mutante *noxy2-2* están clasificados como peroxidasas, glutatión-S-transferasas, NADPH oxidasas, genes de respuesta a toxinas y genes de pared celular, incluyendo arabinogalactanas y poligalacturonasas.

El análisis de los cambios transcriptómicos producidos en respuesta al tratamiento con isoxaben en las plantas silvestres reveló el aumento de la expresión de 177 genes (grupos 1A y 1B) y la disminución de los niveles de transcritos correspondientes a 284 genes (grupos 2A y 2B). Solo un pequeño porcentaje de estos genes (un 11% de los inducidos y

un 17% de los reprimidos, grupos 1A y 2A) cambian su expresión en el *noxy2-2* tras el tratamiento con el herbicida. Además, estos análisis permitieron identificar un pequeño grupo de genes cuya expresión en respuesta a isoxaben varía exclusivamente en el mutante *noxy2-2* (9 genes diferencialmente inducidos, 27 genes diferencialmente reprimidos, grupos 1C y 2C). El listado completo de los genes que cambian en respuesta al tratamiento con isoxaben se recoge en la tabla suplementaria 1 (incluida en el CD).

La aplicación de la función *Gene Ontology* del FatiGO en el análisis de los genes de respuesta al isoxaben puso de manifiesto que el grupo de genes inducidos en Col-0 se encuentra significativamente enriquecido en genes de respuesta a estrés biótico y de producción de metabolitos secundarios (fenipropanoides, flavonoides, terpenoides y fitoalexinas), mientras que el grupo de genes reprimidos se encuentra enriquecido en genes de respuesta a diferentes carbohidratos, fotosíntesis, etileno y herida (tabla suplementaria 2, incluida en el CD).

Independientemente de su función biológica, los resultados de estos análisis revelan que la respuesta transcripcional del mutante *noxy2-2* al isoxaben es significativamente menor a la que ocurre en las plantas silvestres y que, por tanto, la insensibilidad del mutante *noxy2-2* al isoxaben no se debe a un aumento del potencial reparador del daño celular, sino posiblemente a un defecto en la percepción y/o en la señalización del daño en la pared.

Debido a estos resultados y a que el isoxaben actúa sobre la celulosa sintasa reduciendo los niveles de celulosa, quisimos comprobar si la insensibilidad del mutante *noxy2-2* a isoxaben podría deberse a una diferencia en la respuesta de reducción de celulosa y/o en la composición de la pared celular. Para ello, procedimos a evaluar el contenido de celulosa en plántulas silvestres y en el mutante *noxy2-2*, crecidas durante 10 días en medio MS y sometidas al tratamiento con isoxaben durante 24 y 72 horas. En estos análisis pudimos determinar que los niveles de celulosa en las plantas *noxy2-2* y en las plantas silvestres no varían entre sí (Figura 13C), tanto en plántulas sin tratar como en respuesta a isoxaben, en donde los niveles de reducción de celulosa son de un 11% tras 24h de tratamiento y de un 52% tras 72h. De igual forma, el análisis de los componentes de la hemicelulosa (azúcares neutros) y la pectina (ácidos urónicos), antes y después del tratamiento con isoxaben, no reveló diferencias significativas entre las plantas silvestres y el mutante *noxy2-2*.

Estos resultados sugieren que la insensibilidad a isoxaben del mutante *noxy2-2* no es debida a una alteración en la composición de la pared o en la capacidad del isoxaben para inhibir la actividad de las celulosas sintasas, si no a un defecto en la producción de las

señales producidas en respuesta al daño en la pared celular o en la señalización de esta respuesta.

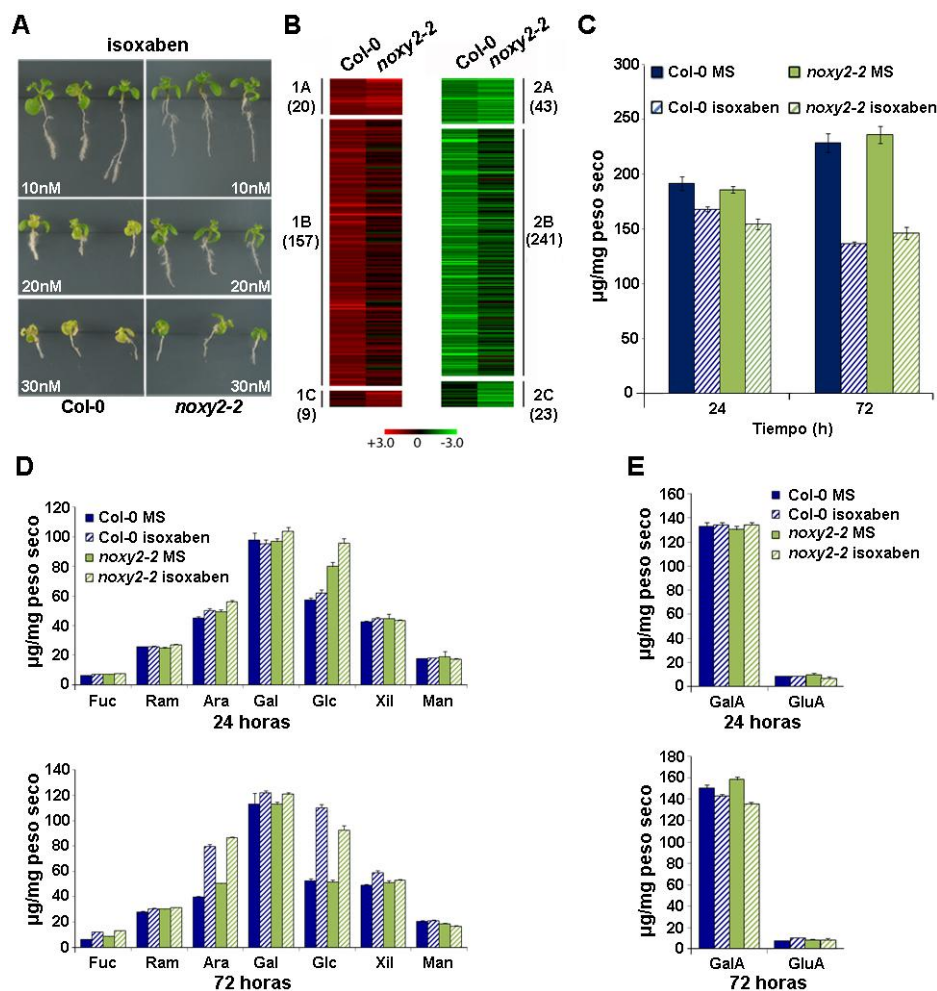


Figura 13. Respuesta del mutante *noxy2-2* y plantas silvestres a isoxaben.

A) Diferencias fenotípicas entre plantas silvestres y *noxy2-2* crecidas durante 3 días en medio MS y transferidas a medio MS suplementado con isoxaben (10, 20 y 30 nM) por cuatro días.

B) Agrupamiento jerárquico de genes diferencialmente expresados en plántulas *noxy2-2* y silvestres tras el tratamiento con isoxaben. El grupo 1A muestra los genes que se inducen en ambos genotipos, el 1B genes que solo se inducen en las plantas silvestres, y el grupo 1C genes diferencialmente inducidos en el mutante *noxy2-2*. Los grupos 2A, 2B y 2C contienen los datos correspondientes a los genes diferencialmente reprimidos.

C) Análisis de los niveles de celulosa en plantas silvestres y *noxy2-2* crecidas durante 15 días en medio MS a las 24 y 72 horas tras el tratamiento con isoxaben (500nM).

D) Análisis de los niveles de azúcares neutros en plantas silvestres y *noxy2-2* crecidas durante 15 días en medio MS a las 24 y 72 horas tras el tratamiento con isoxaben (500nM).

E) Análisis de los niveles de ácidos urónicos en plantas silvestres y *noxy2-2* crecidas durante 15 días en medio MS a las 24 y 72 horas tras el tratamiento con isoxaben (500nM).

4.2 PARTICIPACIÓN DE LOS GENES 9-LOX EN LA RESPUESTA DE DEFENSA FRENTE A LA INFECCIÓN DE PATÓGENOS DE RAÍZ

Los estudios de expresión génica y de determinación de la actividad enzimática realizados en el laboratorio revelaban altos niveles de actividad 9-LOX en la raíz de plantas sanas y la acumulación en estos tejidos de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT. Estos resultados sugerían que, al igual que en las hojas, las oxilipinas derivadas de la activación de las 9-LOXs podrían jugar un papel en la defensa frente a la infección de patógenos de raíz, en donde la pared celular representa una importante barrera defensiva para evitar la infección. Esta circunstancia, junto con los resultados descritos anteriormente en los que demostramos la participación de las enzimas 9-LOXs en la señalización del daño en la pared celular, nos condujo a examinar la participación de las 9-lipooxigenasas en la respuesta de la planta frente a la infección del patógeno radicular *Fusarium oxysporum*.

El hongo *Fusarium oxysporum* es un patógeno radicular que se introduce en la planta preferentemente atravesando los tejidos meristemáticos de la raíz (Czymmek y col., 2007) hasta llegar al tejido vascular, desde donde se expande hacia la parte aérea bloqueando el tejido vascular y produciendo el marchitamiento de la planta.

Los trabajos realizados con objeto de examinar la respuesta de la planta al ataque de *Fusarium* revelaban que la infección provoca cambios transcripcionales cuya funcionalidad se desconoce por el momento (Zhu y col., 2013). El análisis de esta respuesta en comparación con los perfiles transcriptómicos que se producen en los tejidos de raíz de *Arabidopsis* en respuesta al tratamiento con 9-HOT (Vellosillo y col., 2007) puso de manifiesto que, dentro de los 116 genes inducidos en respuesta a la infección de *Fusarium*, el 25% corresponden a genes reprimidos por 9-HOT, mientras que dicho pool no mostraba ninguna correspondencia con los genes que se inducen por 9-HOT. La aplicación de la función *Gene Ontology* del FatiGO en el análisis de los genes que responden de forma antagónica al tratamiento con *Fusarium* y 9-HOT, reveló un enriquecimiento en genes que codifican proteínas que participan en procesos de estrés oxidativo tales como enzimas glutatión transferasa, proteínas de unión a FAD y proteínas de unión a glutatión. La naturaleza de los genes identificados sugiere la activación de un proceso de estrés oxidativo durante la infección por *Fusarium* y que la producción de 9-HOT contribuiría a reducir y a controlar esta respuesta.

Los resultados descritos ponían de manifiesto el antagonismo entre las repuestas de la planta a *Fusarium* y 9-HOT, cuyo significado funcional nos propusimos investigar en este trabajo, procediendo para ello a examinar la respuesta a este patógeno en plantas silvestres y mutantes deficientes en la síntesis de 9-oxilipinas.

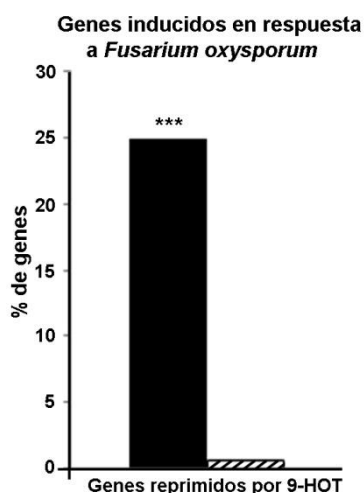


Figura 14. Comparación de los análisis transcriptómicos de respuesta a *Fusarium oxysporum* y a 9-HOT. La barra negra muestra los genes coincidentes en ambas respuestas, mientras que la barra rayada muestra el umbral de coincidencia al azar. Los asteriscos encima de la barra indican diferencias estadísticamente significativas mediante un test binomial *** $p < 0,001$.

4.2.1 La falta de actividad 9-LOX en el mutante *lox1lox5* aumenta la susceptibilidad de la planta a la infección por *Fusarium oxysporum* Fo5176

El análisis de la respuesta a la infección del hongo *Fusarium oxysporum* se realizó tras la aplicación de una suspensión de esporas en las raíces de plantas adultas y examinando los síntomas de infección en la parte aérea de la planta.

En las condiciones experimentales empleadas, los síntomas de infección aparecen a los 7 días de la inoculación y su evaluación se realizó en plantas a los 15 dpi, estableciendo cuatro niveles de intensidad claramente diferenciados, tal y como se observa en la Figura 14A, que se describen a continuación:

- Nivel I: Corresponde al nivel más débil de infección en el que los síntomas comienzan a hacerse visible y en donde se puede visualizar una ligera venación en varias hojas de la planta o una venación intensa en una sola de las hojas de la planta.
- Nivel II: Corresponde con un incremento generalizado en la intensidad de la venación de la mayoría de las hojas de la planta, llegando a visualizarse la aparición de clorosis en al menos la mitad de las hojas de la planta.
- Nivel III: Aparece una necrosis generalizada en la mayoría de las hojas y venación intensa en las hojas restantes.
- Nivel IV: Se produce la necrosis de todas las hojas de la planta.

El resultado del análisis de los síntomas de infección reveló claras diferencias entre las plantas silvestres Col-0 y el mutante *lox1lox5*, carente de actividad 9-lipooxigenasa, tanto en el tiempo de aparición como en la intensidad de los síntomas. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 14, en la que se puede observar que, a los tiempos de infección ensayados (15 días después de la inoculación), todas las plantas *lox1lox5* presentaban síntomas de infección, detectándose la aparición de necrosis foliar en más del

75% de las plantas infectadas (Nivel III). A diferencia de estos resultados, el 20% de las plantas silvestres no mostraban síntomas de infección y la aparición de necrosis se observaba en el 40% de las plantas.

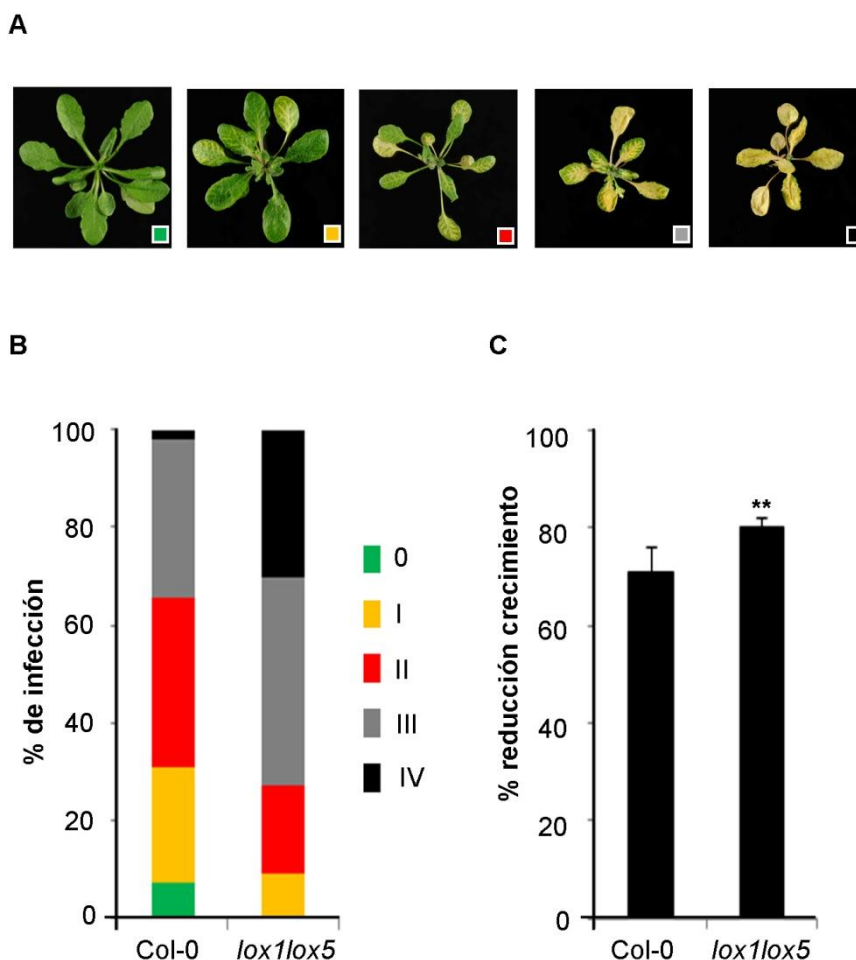


Figura 15. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y del mutante *lox1lox5* a la infección por *Fusarium oxysporum*.

A) Progresión de la infección tras la inoculación con *Fusarium oxysporum* Fo5176 (10^6 esporas/mL). Se muestran ejemplos representativos de los cuatro niveles de infección establecidos, I, II, III y IV, y de la planta control sin infectar.

B) Análisis de los síntomas desarrollados tras la inoculación con *Fusarium oxysporum* Fo5176 (10^6 esporas/mL) en el tipo silvestre y el mutante *lox1lox5*, mostrándose el porcentaje de plantas en los distintos niveles sintomáticos a 10 dpi.

C) Análisis de la reducción del crecimiento del tipo silvestre y el mutante *lox1lox5*, respecto al crecimiento de plantas control, sumergidas en una solución de agua sin esporas. Los asteriscos encima de las barras muestran diferencias significativas. Tes t de Student. ** $p < 0.01$.

Además de la formación de lesiones foliares, la infección por *Fusarium* provoca la detención del crecimiento de la planta y la consiguiente disminución de su tamaño, parámetro que procedimos a cuantificar para determinar el nivel de susceptibilidad de las plantas examinadas. Los resultados de estos ensayos permitieron observar una reducción del crecimiento del 68% en las plantas Col-0 y del 80% en *lox1lox5*. Estos valores apoyan los resultados descritos anteriormente y permiten concluir que la ausencia de actividad 9-lipooxigenasa provoca un aumento en la susceptibilidad de la planta a la infección de

Fusarium y, por tanto, el papel positivo de las 9-LOX en la defensa de la planta frente a la infección de patógenos radiculares tales como *Fusarium oxysporum*.

4.2.2 La ausencia de actividad 9-LOX favorece la adhesión de *Fusarium oxysporum* a la raíz de la planta

Los datos descritos anteriormente demostraban el aumento de la susceptibilidad del mutante *lox1lox5* a la infección de *F. oxysporum* y que las diferencias entre las plantas *lox1lox5* y Col-0 se apreciaban tanto en la intensidad de los síntomas como en el tiempo de aparición. Para caracterizar en mayor detalle las diferencias entre las plantas analizadas, procedimos a examinar la infección en tejidos de raíz utilizando plántulas crecidas en medio MS. Además, y para facilitar estos análisis, preparamos una construcción en la que la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) se fusionó al promotor constitutivo GPD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y se introdujo en *Fusarium* mediante transformación (utilizando *Agrobacterium*). La selección de cepas transgénicas de *Fusarium* que expresan la proteína GFP nos permitió examinar la infección utilizando microscopía de fluorescencia. Para ello, sumergimos plantas individuales en una suspensión de 10^5 esporas/ml y se mantuvieron en régimen hidropónico para examinar la infección a los 2, 3 y 4 días post-infección.

En primer lugar, procedimos a examinar el patrón de adhesión y crecimiento de las hifas en el exterior de la raíz, observando el número de puntos de entrada y la intensidad de la fluorescencia en cada uno de ellos. Los resultados de estos análisis permiten observar la acumulación de hongo en las zonas meristemáticas de la raíz, tanto de la raíz principal como de las secundarias. Estas zonas, junto con las aberturas naturales que se producen en el nacimiento de las raíces laterales, constituyen los puntos de entrada preferidos de los patógenos de raíz (Stone y col., 2001; Zolobowska y Van Gigsegem, 2006; Czymbek y col., 2007). La cantidad de biomasa fúngica que se acumula alrededor de los ápices radiculares a los 2dpi es mucho mayor en el mutante *lox1lox5* que en las plantas control, (Figura 15). Estas diferencias se mantienen a los 3dpi, en donde en el mutante *lox1lox5* las hifas se extienden a lo largo de la parte externa de la raíz originando grandes cantidades de hongo que se acumula preferentemente alrededor de los ápices; mientras que a este tiempo el número de hifas que se observa en las plantas control empieza a proliferar y es, por tanto, mucho menor que en el mutante *lox1lox5*. A los 4 días de infección, los ápices radiculares del mutante *lox1lox5* han perdido toda su turgencia, debido al colapso celular producido por la invasión fúngica (Czymbek y col., 2007), mientras que en Columbia las hifas están empezando a avanzar por la parte externa de la raíz.

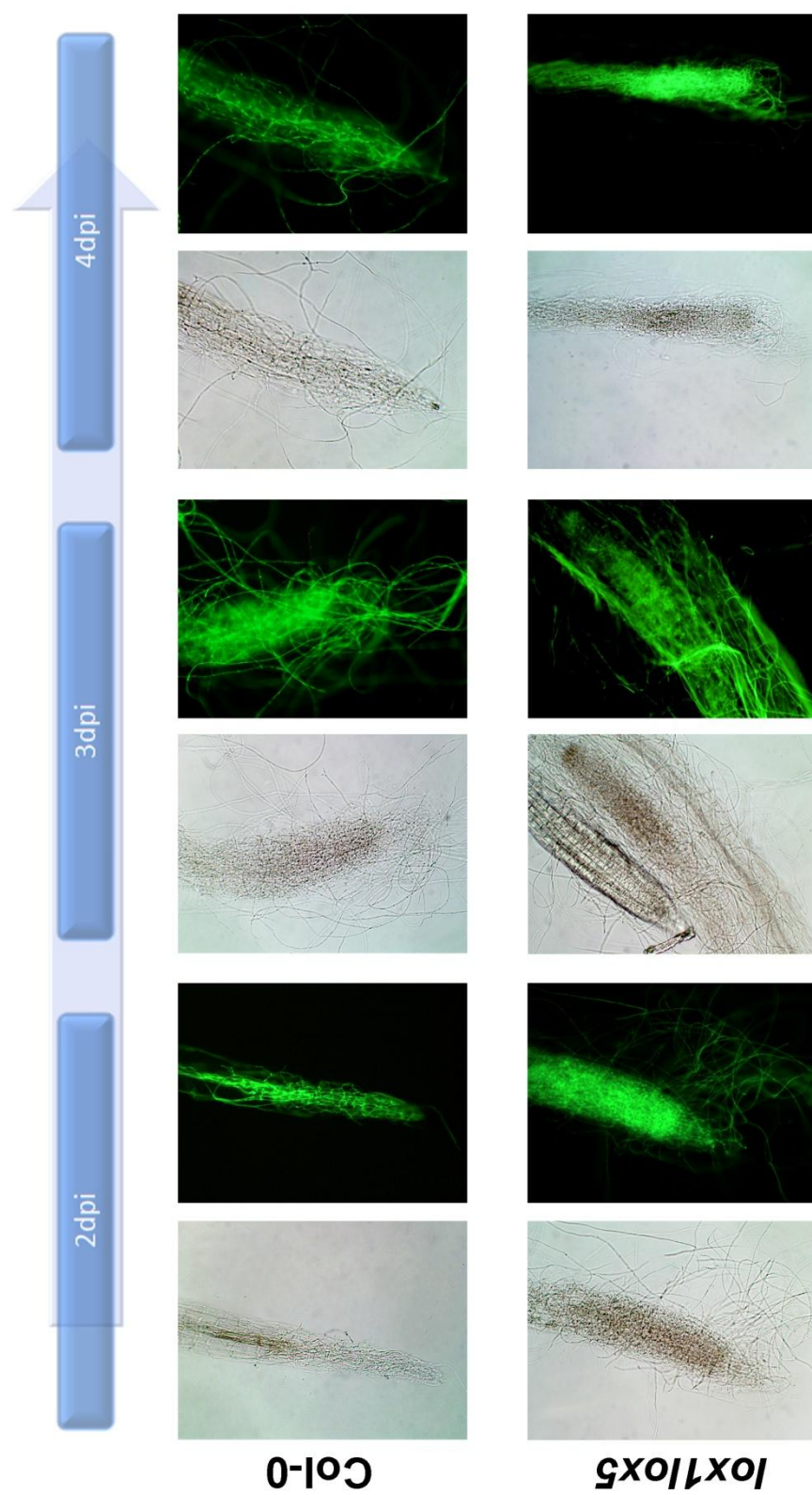


Figure 16. Caracterización de la adhesión de *Fusarium oxysporum* al ápice de la raíz. Mostramos imágenes representativas de la adhesión de *Fusarium oxysporum* Fo5176 GPD::GFF, a los 2, 3 y 4 días post-infección en plántulas de *Col-0* y *lox1/lox5*. Las plántulas fueron crecidas previamente en medio MS0,5X durante 7 días, y transferidas a tubos Eppendorf conteniendo una solución de esporas de 10^6 esporas/ml.

4.2.3 La ausencia de actividad 9-LOX favorece la invasión de *Fusarium oxysporum* a de los haces vasculares de la raíz

Durante el proceso de infección y tras la rotura de la pared celular y de su entrada en la planta, las hifas de *Fusarium* alcanzan los haces vasculares, desde los que avanza al resto de los tejidos. La invasión de los haces vasculares tiene como consecuencia la aparición de síntomas, debido al taponamiento de los vasos, tanto por parte del hongo como por parte de la planta, que acumula compuestos como geles o gomas para detener el avance del hongo (Pietro y col., 2003). Por este motivo, quisimos examinar si la aparición temprana de síntomas y la severidad de los mismos en el mutante *lox1lox5* estaban relacionadas con la capacidad de penetración del hongo en la planta.

El análisis de las plantas examinadas permite determinar que, mientras que a los 2dpi las hifas se localizan en la parte externa de la raíz de las plantas control, en el mutante *lox1lox5* el hongo ya ha penetrado hasta los haces vasculares. El retraso en la progresión de la infección *Fusarium* en las plantas control se observa igualmente a los tres días, en donde el hongo comienza a colonizar los haces vasculares, mientras que las raíces del mutante se encuentran completamente invadidas por *Fusarium*, tal y como nos muestra la fluorescencia de la figura. Finalmente, el análisis de las plantas a los cuatro días de infección permite observar claras aberturas por las que penetra el hongo en las plántulas silvestres, mientras que las raíces del mutante se encuentran completamente devastadas, observándose incluso partes de la pared celular degradadas, y los vasos expuestos al medio.

Estos resultados ponen de manifiesto que la falta de actividad 9-LOX en la planta favorece la penetración del hongo en la raíz y su progresión en los tejidos infectados, demostrando así que la actividad 9-LOX participa en la protección temprana contra este patógeno.

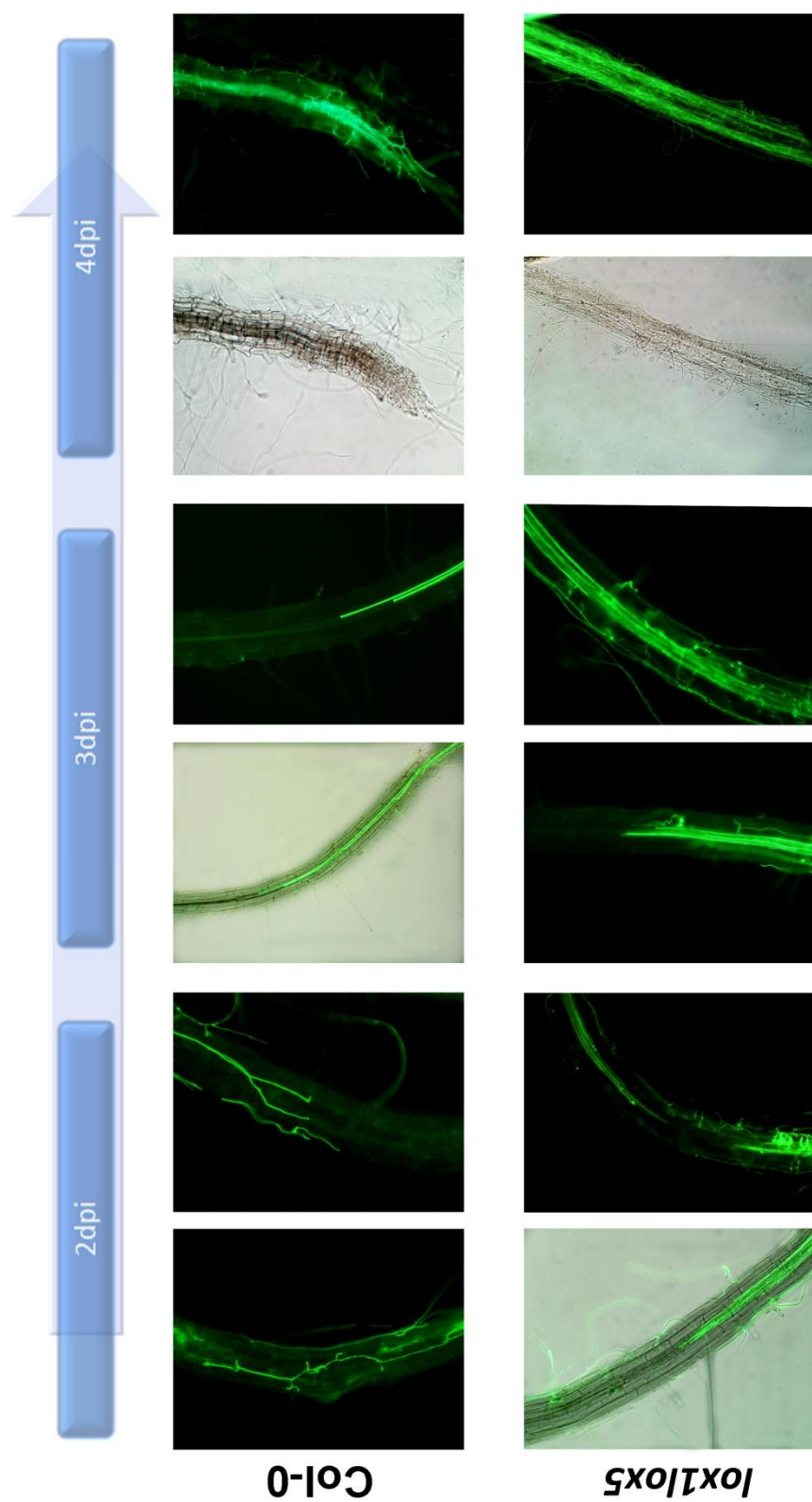


Figura 17. Caracterización de la invasión de la raíz por el hongo *Fusarium oxysporum*. Mostramos imágenes representativas de la adhesión de *Fusarium oxysporum* Fo5176 GPD::GFP, a los 2, 3 y 4 días post-infección en plántulas de Col-0 y *lox1lox5*. Las plántulas fueron crecidas previamente en medio MS0,5X durante 7 días, y transferidas a tubos Eppendorf conteniendo una solución de esporas de 10^6 esporas/ml.

4.2.4 Defectos en la señalización de las 9-oxilipinas afectan a la defensa contra *Fusarium oxysporum*

Los resultados que ponen de manifiesto el aumento en la susceptibilidad del mutante *lox1lox5* frente a la infección de *Fusarium* nos condujo a examinar la respuesta de los mutantes *noxy*, deficientes en la percepción de 9-HOT, a este patógeno.

Los mutantes *noxy2-2* y *noxy1*, previamente caracterizados, se seleccionaron para este estudio. El gen *NOXY2* codifica una proteína mitocondrial de función desconocida, cuya mutación aumenta la susceptibilidad de la planta frente a la infección de la bacteria hemibiotrofa *Pst* DC3000. A su vez, el gen *NOXY1* codifica una proteína de la familia de las PPRs (del inglés, PENTRATRICOPEPTIDE REPEAT CONTAINING PROTEIN), y su mutación favorece la resistencia de la planta frente a la infección de *Pst* DC3000.

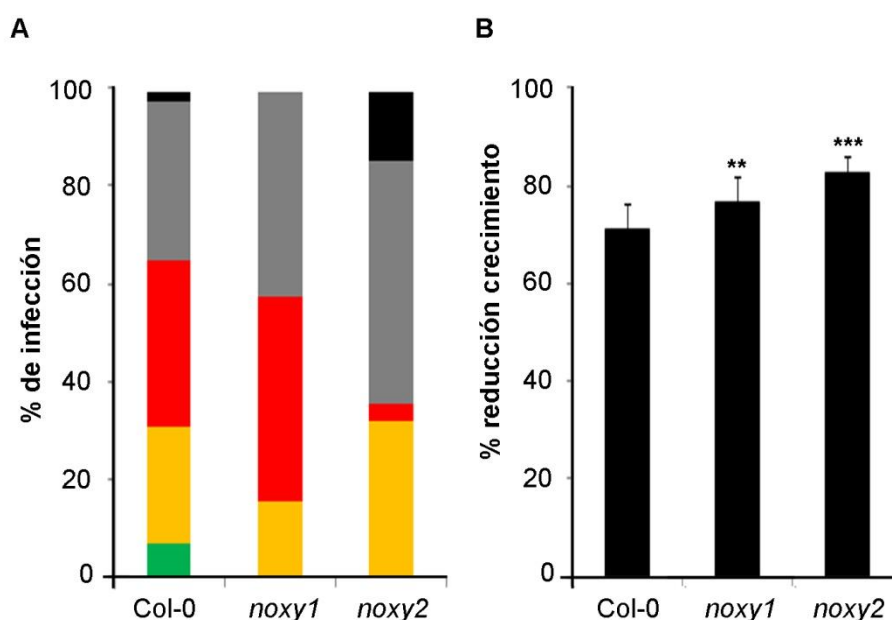


Figura 18. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y mutantes a la infección por *Fusarium oxysporum*.

A) Análisis de los síntomas desarrollados tras la inoculación con *Fusarium oxysporum* Fo5176 (10^6 esporas/mL) en el tipo silvestre y los mutantes *noxy1* y *noxy2*, mostrándose el porcentaje de plantas en los distintos niveles sintomáticos a 10 dpi.

B) Análisis de la reducción del crecimiento de Col-0 y los mutantes *noxy1* y *noxy2*, respecto al crecimiento de plantas control, sumergidas en una solución de agua sin esporas. Los asteriscos encima de las barras muestran diferencias significativas. Test de Student, *** p<0,001; ** p<0,01.

El análisis de los mutantes seleccionados puso de manifiesto que, mientras que la respuesta a la infección del mutante *noxy1* no varía significativamente de la caracterizada en las plantas control, el mutante *noxy2-2* es más susceptible que las plantas silvestres. En este mutante se aprecia la formación de síntomas en todas las plantas analizadas y la formación de necrosis en más del 60% de ellas. Por otro lado, el análisis del crecimiento vegetal reveló una reducción de tamaño en ambos mutantes tras la infección superior a la

correspondiente a las plantas control. Estos resultados permiten concluir que ambos mutantes son más susceptibles a la infección del hongo examinado, aunque la susceptibilidad es mayor en el mutante *noxy2-2*.

Para examinar en mayor detalle la contribución de las proteínas NOXY1 y NOXY2 a la infección, procedimos a examinar si la producción constitutiva en plantas transgénicas alteraba la respuesta a la infección por *Fusarium*. Los resultados de estos ensayos permitieron comprobar que la sobreexpresión de la proteína NOXY1 aumenta la resistencia a *Fusarium*, tanto con respecto a la formación de síntomas, donde encontramos un 50% de plantas asintomáticas, como al tamaño de la planta, donde observamos que la detención del crecimiento es menor: las plantas infectadas solo son un 40% más pequeñas que las sin infectar. A diferencia de estos resultados, la sobreexpresión de la proteína NOXY2 no produce ninguna modificación aparente en la respuesta de la planta a la infección de *Fusarium* en ninguno de los parámetros examinados.

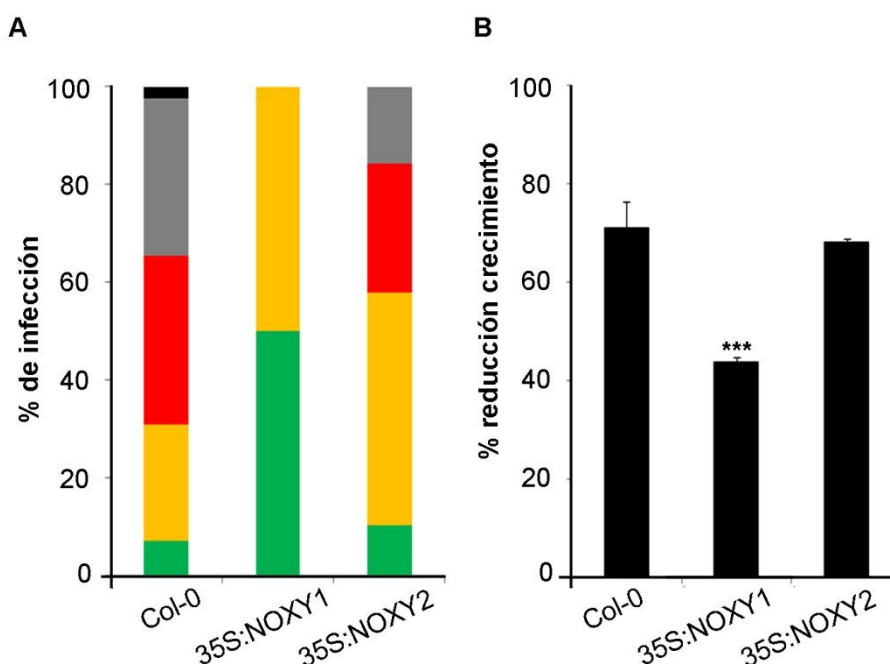


Figura 19. Análisis de la respuesta de plantas silvestres y transgénicas a la infección por *Fusarium oxysporum*.

A) Análisis de los síntomas desarrollados tras la inoculación con *Fusarium oxysporum* Fo5176 (10^6 esporas/mL) en el tipo silvestre y las plantas transgénicas 35S:NOXY1 y 35S:NOXY2, mostrándose el porcentaje de plantas en los distintos niveles sintomáticos a 10 dpi.

B) Análisis de la reducción del crecimiento de Col-0 y los mutantes *noxy1* y *noxy2*, respecto al crecimiento de plantas control, sumergidas en una solución de agua sin esporas. Los asteriscos encima de las barras muestran diferencias significativas. Test de Student, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Discusión

5. DISCUSIÓN

Los trabajos realizados en el laboratorio habían puesto de manifiesto la participación de la ruta de síntesis de oxilipinas iniciada por las 9-LOX en la defensa de *Arabidopsis* frente a la infección de bacterias hemibiotrofas y que las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT actúan como señales en la activación de la defensa de la planta. (Lopez y col., 2011; Vicente y col., 2012). La caracterización de la respuesta a la aplicación de 9-HOT y 9-KOT permitió identificar genes que responden a dichos compuestos modificando su nivel de expresión y concluir que la acción defensiva de estas señales celulares está asociada a la generación de un estallido oxidativo y a la modificación de la pared. Estudios posteriores con mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la señalización de 9-HOT (*noxy*, del inglés *non-responding to oxylipins*), permitieron comprobar que la insensibilidad a esta oxilipina estaba con frecuencia asociada a una insensibilidad parcial al isoxaben (Vellosillo y col., 2013), un inhibidor de la celulosa sintasa cuya aplicación provoca la detención del crecimiento de la planta y el desencadenamiento de respuestas de reparación (Heim y col., 1990b; Manfield y col., 2004; Bischoff y col., 2009). Estos resultados sugerían que las modificaciones en la pared celular inducidas por las 9-oxilipinas podrían, a su vez, activar procesos de señalización relacionados con los mecanismos de reparación de la pared celular, los cuales también se activan en respuesta al daño celular asociado a la infección de patógenos.

En este trabajo hicimos uso del mutante *lox1lox5*, deficiente en actividad 9-LOX y del mutante *noxy2-2*, insensible a 9-HOT y isoxaben, con objeto de estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la activación de las 9-LOXs y los procesos de señalización regulados por las oxilipinas, que conducen a la inducción de respuestas de defensa vegetal relacionadas con la pared celular.

El análisis de las alteraciones fenotípicas provocadas por el isoxaben, utilizado como activador de una respuesta de reparación del daño en la pared celular permitió observar que la falta de actividad 9-LOX en el mutante *lox1lox5* provoca un aumento en la susceptibilidad de la planta al herbicida al compararlo con las plantas control (Figura 1). Esta respuesta se manifiesta en el acortamiento de la raíz principal de plántulas crecidas en medio con isoxaben, en las que la reducción de la longitud de la raíz es un 33% mayor en el mutante *lox1lox5* que en las plantas control. La participación de las enzimas 9-LOXs en la respuesta al daño celular se sustenta además por los resultados que demuestran que la aplicación de 9-HOT o 9-KOT junto al isoxaben provoca una reversión parcial del acortamiento radicular producido por el herbicida. Dicha reversión es menor en el mutante *lox1lox5* que en las plantas control (Figura 2), lo que estaría de acuerdo con los trabajos en los que se propone que la aplicación de oxilipinas potencia la activación de las 9-LOX, en un bucle de retroalimentación positivo.

El análisis de oxilipinas adicionales, generadas a través de las rutas de síntesis iniciadas por las 9-LOXs, 13-LOXs y α -DOX, permitió identificar otros compuestos que provocaban la reversión parcial del acortamiento radicular inducido por el isoxaben. Estos compuestos correspondían al grupo de oxilipinas inductoras del fenotipo de rizo radicular y en su mayoría poseen un grupo cetónico en su estructura molecular. A diferencia de estos compuestos, la aplicación de oxilipinas inductoras de otros fenotipos a través de rutas de señalización independientes, tales como el 9-oxo-C₉, el JA o el OPDA (Vellosillo y col., 2007), no produjo la reversión del acortamiento radicular provocado por el isoxaben (Figura 3). Con respecto a estos resultados, cabe mencionar que estudios anteriores habían señalado la participación del ácido jasmónico en la respuesta a isoxaben (Caño-Delgado y col., 2003; Denness y col., 2011); no obstante, los análisis realizados en este trabajo no permiten observar diferencias fenotípicas en la respuesta al isoxaben de los mutantes de JA *coi1-1* y *aos* con respecto a las plantas control y descartan la participación del ácido jasmonico en la activación del fenotipo examinado (Figura 4). Es posible, por tanto, que la acción de distintas oxilipinas participe en la regulación de procesos de señalización asociados a fenotipos distintos, o/y que distintos productos actúen en distintos tejidos o estadios de desarrollo de la planta. Independientemente de estas posibilidades, los resultados descritos ponen de manifiesto la acción antagonista de las oxilipinas inductoras del rizo radicular con el daño celular y que dicha acción no está limitada a los compuestos producidos a través de una única ruta de síntesis de oxilipinas sino, que está en relación con la estructura molecular de estos compuestos.

El fenotipo de rizo radicular, junto con la participación del 9-HOT y del 9-KOT en la regulación de la señalización del daño en la pared mostraba un claro paralelismo con las funciones asignadas al 24-epi-brasinólido (BL), uno de los brasinoesteroides más activos, que participa en la reparación del daño en la pared celular y activa un fenotipo de rizo en la raíz de plantas silvestres similar al producido por las oxilipinas (Lanza y col., 2012; Wolf y col., 2012). Los resultados del análisis fenotípico de los mutantes *bri1-1* y *det2-1* realizado en este trabajo han puesto de manifiesto que las acciones del 9-KOT y 9-HOT como señales inductoras del rizo radicular y como antagonistas del daño celular inducido por el isoxaben se establecen mediante la activación de la síntesis de BRs y de su señalización (Figuras 5, 7 y 8). Además, la respuesta del mutante *lox1lox5* a la aplicación de BL pone de manifiesto la actuación secuencial de las oxilipinas y los BRs en la activación de las actividades examinadas. La participación de los BRs en la señalización de las oxilipinas se sustenta igualmente por los resultados en los que se observa que la activación de la expresión de genes de respuesta a oxilipinas está comprometida en el mutante *det2-1* (Figura 5).

Los resultados obtenidos mediante la caracterización de plantas transgénicas con expresión constitutiva de la proteína BKI1:YFP, permiten confirmar que la aplicación de 9-KOT y 9-HOT activa la señalización de BRS. En estos ensayos hemos podido comprobar que la proteína BKI1, cuya unión al receptor de BRs inhibe la activación de la señalización, se libera de la membrana plasmática en respuesta al tratamiento con oxilipinas (Figura 8). Además, los análisis que demuestran que el 36% de los genes de respuesta a 9-KOT corresponden a genes regulados por los BRs, sustenta los resultados que ponen de manifiesto la activación de la señalización de BRs en la respuesta al tratamiento con 9-KOT (Figura 9).

El hecho de que la aplicación del trólox, un análogo del α -tocoferol con capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos, inhiba la acción del 9-KOT y 9-HOT como inductores de señalización de BRs, permite proponer que la peroxidación de lípidos y estrés oxidativo producidos por la acción de estas oxilipinas serían la señal que contribuiría a activar la síntesis y señalización de los BRs. En este contexto, las oxilipinas caracterizadas podrían considerarse señales de daño celular y quizá de estrés oxidativo, que inducirían la señalización de BRs como parte de los mecanismos de reparación de la pared celular, ya que esta hormona actúa como reguladora de la homeostasis de la pared y del crecimiento celular. Cabe destacar que el tratamiento con trólox favorece la retención de la proteína BKI1:YFP en la membrana de las plantas y que, por tanto, la peroxidación lipídica y el estado de oxidación de los lípidos de membrana podría participar en la regulación de la ruta de los BRs.

Nuestros resultados establecen una relación entre las rutas de señalización de las 9-LOXs y los BRs con la modificación y/o reparación de la pared celular. Esta relación se puede extrapolar a la respuesta de defensa de la planta y, en concreto, a las modificaciones de la pared celular que contribuyen a reforzar esta estructura, la cual actúa como barrera para limitar el progreso de la infección. Esta idea se ve reforzada por los resultados que demuestran que la acumulación de depósitos de calosa en la raíz de la planta tras el tratamiento con 9-HOT requiere un aumento en la síntesis de BRS y la activación de su señalización. La calosa es un polímero de pared celular que forma parte de la respuesta de defensa de la planta y contribuye a limitar la entrada de patógenos (Vorwerk y col., 2004; Luna y col., 2011). Hasta el momento, los estudios en relación al papel de los brasinoesteroides se habían limitado a su función en el control del crecimiento y desarrollo de la planta; sin embargo, recientemente ha cobrado interés su participación en la regulación del balance crecimiento-defensa (Lozano-Duran y col., 2013; Belkhadir y col., 2014). Los resultados que muestran que los productos de las 9-LOXs activan la ruta de los BRs para producir la deposición de calosa, indican que ambas rutas pueden participar en

la inducción de la defensa a nivel de la pared celular durante la infección de patógenos. En este contexto, el papel de los brasinoesteroides en las modificaciones de la pared celular que acompañan a la defensa de la planta se ve reforzado por los resultados que demuestran que el tamaño de los depósitos de calosa formados tras la infección de *Pst* DC3000 es 2,5 veces mayor en plantas mutantes *bes1-D* con expresión constitutiva de BRs que en plantas control (Figura 11).

La idea de que ambas respuestas puedan colaborar en la modificación de la pared celular se ve apoyada por los resultados que demuestran que los mutantes *bri1-1* y *det2-1*, afectados en la síntesis y señalización de BR respectivamente, no recuperan la longitud de la raíz en presencia de 9-KOT e isoxaben, mientras que los mutantes *bzr1-1D* y *bes1-D*, con la ruta de los brasinoesteroides constitutivamente activada, son parcialmente insensibles al herbicida. Aún así, la aplicación de BL en presencia de isoxaben no revierte el fenotipo de acortamiento provocado por el isoxaben (Figura 12), lo que indica que es la acción conjunta de ambos compuestos, 9-KOT y BL, la que favorece la reversión del fenotipo y la reparación del daño celular. El hecho de que la aplicación de BL por sí solo no produzca formación de calosa en raíces de plantas silvestres, demuestra que ambos compuestos son necesarios y colaboran en la modificación de la pared celular examinada en este trabajo. La cooperación de los brasinoesteroides y las oxilipinas es consistente con los datos de estudios de RNA-seq y micromatrices en respuesta a brasinoesteroides. La ruta de señalización de BRs finaliza con la activación de los factores de transcripción *BZR1* y *BZR2* (o *BES1*) que regulan la respuesta a esta hormona. Sin embargo, las dianas de *BZR1* y *BZR2* no coinciden en todos los casos con los genes de respuesta a brasinoesteroides (Sun y col., 2010) lo que indica que las respuestas a esta hormona, pueden requerir la cooperación con otros compuestos, tales como por ejemplo las 9-oxilipinas. La confirmación de esta posibilidad requiere la realización de estudios y experimentos adicionales que escapen a los objetivos de este trabajo.

La igual que ocurre con la calosa, la acumulación de lignina está frecuentemente asociada a la modificación de la pared celular que acompaña a la activación de una respuesta de defensa. El análisis de la acumulación de lignina en la respuesta al isoxaben permitió comprobar que la formación de lignina ectópica requiere la producción de BRs y la activación de la señalización regulada por esta hormona.

El fallo en la producción de lignina y de calosa en respuesta a isoxaben y 9-KOT de los mutantes de BRs examinados, enlaza con los resultados descritos para los mutantes *noxy*, deficientes en la producción de lignina y calosa en respuesta a estos tratamientos. Estos resultados nos condujeron a examinar la respuesta del mutante *noxy2-2* a la aplicación de isoxaben, para lo que procedimos a realizar ensayos transcriptómicos y a examinar el

contenido de los componentes de la pared celular que se producen en respuesta al tratamiento con isoxaben

El estudio transcripcional realizado reveló que la respuesta a isoxaben es menor en el mutante *noxy2-2* que en las plantas control, tanto en relación al número de genes como a la intensidad de los cambios detectados (Figura 13). Por otro lado, el análisis del contenido de celulosa, azúcares neutros y ácidos urónicos tras el tratamiento con isoxaben reveló que la respuesta del mutante *noxy2-2* era similar a la caracterizada en las plantas silvestres. Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto que la insensibilidad al isoxaben no era consecuencia de una mayor capacidad de reparación del daño celular en el mutante, ni tampoco de una alteración de la pared celular que pudiera reducir la capacidad de percepción del daño.

Por otro lado, la ausencia de diferencias en la composición de la pared celular entre las plantas silvestres y el mutante *noxy2-2* implica que la detención del crecimiento en respuesta a la aplicación de isoxaben en las plantas Col-0 no se debe exclusivamente a la reducción de la cantidad de celulosa, sino a respuestas de señalización posteriores que estarían limitadas en el mutante *noxy2-2* en comparación con las plantas control (Caño-Delgado y col., 2003; Denness y col., 2011). En este contexto, cabe mencionar que la mutación *noxy2-2* provoca una disfunción mitocondrial (Vellosillo y col., 2013) que, en base a los resultados obtenidos en este trabajo, estaría limitando la capacidad de la célula para percibir y responder al daño, con lo que nuestros resultados sugieren un posible papel de la mitocondria en la activación de la señalización de pared celular.

Una última parte de los experimentos realizados en este trabajo se dirigió a examinar la participación de la ruta de las 9-LOX en la respuesta de defensa de la planta a la infección de patógenos de raíz, concretamente al hongo *Fusarium oxysporum*. Nuestro interés en estos estudios se basaba en los resultados que habían demostrado la participación de las 9-LOX en las modificaciones de la pared celular dirigidas a controlar la invasión de los patógenos en la planta y en resultados que demostraban altos niveles de actividad 9-LOX en la raíz de la planta (Vellosillo y col., 2007).

La comparación de los análisis transcriptómicos de respuesta al 9-HOT en raíces de *Arabidopsis* con los correspondientes a datos públicos de respuesta a *Fusarium oxysporum*, apoya la posible participación de las 9-LOX en la respuesta a la infección de este patógeno. El análisis ontológico de los genes coincidentes en ambas respuestas, mostró que la infección por *Fusarium* activa un proceso de estrés oxidativo y que la producción de 9-HOT contribuiría a reducir y a controlar esta respuesta. Se desconoce si los genes comunes a ambos tratamientos corresponden a genes de susceptibilidad o resistencia, por lo que para determinar su funcionalidad y la posible participación de las 9-LOXs en la defensa

frente a este patógeno, procedimos a examinar el proceso de infección en plantas control silvestres y en plantas mutantes *lox1lox5*. Igualmente, en estos ensayos examinamos el efecto de las mutaciones *noxy1* y *noxy2-2*, así como el de la sobreexpresión de estas proteínas en la respuesta de la planta a la infección.

Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto que el defecto en la actividad 9-LOX aumenta la susceptibilidad a la infección, ya que las plantas mutantes muestran una mayor intensidad en síntomas, así como una mayor reducción del crecimiento tras la infección (Figura 15). De acuerdo a estos resultados, la comparación del proceso de infección en plántulas silvestres y en el mutante *lox1lox5* permitió observar un aumento en el número de puntos de entrada de hongo en el mutante, así como la presencia de hifas en los haces vasculares (Figuras 16 y 17). Estos resultados indican la participación de las 9-LOX en la defensa frente a *Fusarium oxysporum* y que la falta de esta actividad favorece la penetración del hongo en la planta. Por otro lado, cabe mencionar que los hongos, entre ellos los del género *Fusarium*, producen hidroperóxidos de estructura molecular similar a las oxilipinas de plantas, y que estos hidroperóxidos regulan procesos tales como el desarrollo de las esporas, la reproducción y la producción de toxinas (Champe y col., 1987; Nakayama y col., 1996; Tsitsigiannis y Keller, 2007; Christensen y Kolomiets, 2011). De esta manera, las oxilipinas producidas en ambos organismos, plantas y hongos, pueden determinar el resultado de la interacción. En este contexto, la disminución en la producción de oxilipinas en el mutante *lox1lox5* podría alterar el desarrollo de las hifas de *Fusarium* durante la infección. En este caso, y de acuerdo al mayor crecimiento de las hifas en el mutante *lox1lox5*, la disminución en las oxilipinas de la planta favorecería la proliferación fúngica.

Al igual que el mutante *lox1lox5*, los mutantes *noxy2-2* y *noxy1* resultaron ser más susceptibles a la infección que las plantas silvestres, mientras que la sobreexpresión de la proteína NOXY1 aumenta la resistencia de la planta. El gen *NOXY1* codifica una proteína de la familia de las PENTATRICOPEPTIDE REPEAT CONTAINING PROTEIN, que contiene dominios repetidos que pueden interaccionar con el ADN y ARN, contribuyendo así a la regulación de la expresión génica. Independientemente de la función de las proteínas NOXY1 y NOXY2, los resultados de estos análisis permiten confirmar la participación de la señalización de las 9-LOX en la defensa frente a *Fusarium*. Finalmente, y aunque estos resultados representan una primera aproximación al estudio de la interacción de la raíz con el hongo *Fusarium*, la caracterización de los mutantes *noxy* abre una vía de interés para examinar los mecanismos de defensa de la raíz y para identificar los componentes celulares que participan en la ruta de señalización regulada por la acción de las 9-lipoxygenasas.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. Las enzimas 9-lipooxigenasas participan en la señalización de la respuesta de la planta al daño en la pared celular, como se concluye de los resultados que muestran que la pérdida de esta actividad provoca el aumento de la susceptibilidad de la planta al daño producido por el herbicida isoxaben, y que la presencia de los derivados de las 9-LOXs, 9-HOT y 9-KOT, producen la reversión parcial de esta respuesta.
2. La aplicación de 9-HOT y 9-KOT induce la síntesis y la señalización de brasinoesteroides en plantas silvestres sanas, mientras que la actividad de los tocoferoles en la protección de los lípidos de membrana inhibe la activación de la señalización de los brasinoesteroides
3. La acción de las 9-oxilipinas en la activación de procesos de reparación del daño en la pared y de respuestas de defensa relacionadas con la modificación de la pared, tales como la acumulación de depósitos de callosa, se ejerce a través de la inducción de la síntesis y la señalización de BRs
4. La activación de las respuestas estudiadas requiere la participación secuencial de ambas rutas de señalización, 9-LOX y BRs.
5. La activación constitutiva de la señalización de los brasinoesteroides en el mutante *bes1-D* facilita la activación de respuestas de defensa vegetal relacionadas con la modificación de la pared celular.
6. La acumulación de lignina ectópica en respuesta al daño celular producido por el isoxaben requiere la inducción de la síntesis y señalización de BRs.
7. La caracterización del mutante *noxy2-2*, insensible a la aplicación de oxilipinas e isoxaben, indica que la insensibilidad al herbicida se debe a un defecto en percepción del daño celular y en la producción de las señales celulares implicadas en la activación de la ruta de la integridad de la pared celular.
8. La actividad 9-LOX forma parte de los mecanismos de defensa de la raíz de la planta frente a la infección del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, como se

concluye de los resultados que demuestran que la pérdida de actividad 9-LOX provoca un aumento en la susceptibilidad de la planta y favorece la adhesión y la penetración del hongo a la raíz.

9. Las mutaciones *noxy1* y *noxy2* afectan a la señalización de las 9-LOX y aumentan la susceptibilidad de la plantas frente a la infección de *Fusarium*, mientras que la sobreexpresión de la proteína NOXY1 aumenta la resistencia de la planta a la infección por este hongo.

Bibliografía

- Al-Shahrour, F., Díaz-Uriarte, R., & Dopazo, J. (2004). FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*, 20(4), 578-580.
- Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Tarraga, J., Montaner, D., Alloza, E., Vaquerizas, J. M., Conde, L., Blaschke, C., Vera, J., & Dopazo, J. (2006). BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res*, 34(Web Server issue), W472-476.
- Albrecht, C., Boutrot, F., Segonzac, C., Schwessinger, B., Gimenez-Ibanez, S., Chinchilla, D., Rathjen, J. P., de Vries, S. C., & Zipfel, C. (2012). Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(1), 303-308.
- Álvarez, M. E. (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology*, 44, 429-442.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 373-399.
- Armstrong, G. M., & Armstrong, J. K. (1981). *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. . *Fusarium: diseases, Biology and Taxonomy* (Cook, R. ed.), 391-399.
- Bannenberg, G., Martinez, M., Hamberg, M., & Castresana, C. (2009a). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, 44(2), 85-95.
- Bannenberg, G., Martinez, M., Rodriguez, M. J., Lopez, M. A., Ponce de Leon, I., Hamberg, M., & Castresana, C. (2009b). Functional analysis of alpha-DOX2, an active alpha-dioxygenase critical for normal development in tomato plants. *Plant Physiol*, 151(3), 1421-1432.
- Belkhadir, Y., Jaillais, Y., Eppele, P., Balsemao-Pires, E., Dangl, J. L., & Chory, J. (2012). Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(1), 297-302.
- Belkhadir, Y., Yang, L., Hetzel, J., Dangl, J. L., & Chory, J. (2014). The growth-defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors. *Trends Biochem Sci*.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the royal statistical society*, 57(1), 289-300.
- Berrocal-Lobo, M., & Molina, A. (2004). Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 7, 763-770.
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y., & King, J. (2009a). Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J Exp Bot*, 60(2), 509-521.
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y., & King, J. (2009b). Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling and Behavior*, 4, 158-159.
- Bischoff, V., Cookson, S. J., Wu, S., & Scheible, W. R. (2009). Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Exp Bot*, 60(3), 955-965.
- Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci*, 7, 315-322.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 60, 379-406.
- Boutrot, F., Segonzac, C., Chang, K. N., Qiao, H., Ecker, J. R., Zipfel, C., & Rathjen, J. P. (2010). Direct transcriptional control of the *Arabidopsis* immune receptor FLS2 by the

- ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14502-14507.
- Brooks, D. M., Bender, C. L., & Kunkel, B. N.** (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol*, 6(6), 629-639.
- Browse, J.** (2009). Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annu Rev Plant Biol*, 60(1), 183-205.
- Caño-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M., & Bevan, M.** (2003). Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, 34, 351-362.
- Cristescu, S. M., De Martinis, D., te Lintel Hekkert, S., Parker, D. H., & Harren, F. J. M.** (2002). Ethylene Production by *Botrytis cinerea* In Vitro and in Tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5342-5350.
- Czymmek, K. J., Fogg, M., Powell, D. H., Sweigard, J., Park, S. Y., & Kang, S.** (2007). In vivo time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol*, 44(10), 1011-1023.
- Champe, S. P., Rao, P., & Chang, A.** (1987). An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 133, 1383-1387.
- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M. K., Yu, K., Sekine, K. T., Gao, Q. M., Selote, D., Hu, Y., Stromberg, A., Navarre, D., Kachroo, A., & Kachroo, P.** (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat Genet*, 43(5), 421-427.
- Chaturvedi, R., Krothapalli, K., Makandar, R., Nandi, A., Sparks, A. A., Roth, M. R., Welti, R., & Shah, J.** (2008). Plastid omega3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of *Arabidopsis thaliana* is independent of jasmonic acid. *Plant J*, 54(1), 106-117.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., Cai, R., Zuo, J., Tang, X., Li, X., Guo, H., & Zhou, J. M.** (2009). ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21(8), 2527-2540.
- Choi, J., Choi, D., Lee, S., Ryu, C. M., & Hwang, I.** (2011). Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci*, 16(7), 388-394.
- Christensen, S. A., & Kolomiets, M. V.** (2011). The lipid language of plant-fungal interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 4-14.
- Dangl, J., & Jones, J.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826-833.
- de Torres Zabala, M., Bennett, M. H., Truman, W. H., & Grant, M. R.** (2009). Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *Plant J*, 59(3), 375-386.
- Denance, N., Sanchez-Vallet, A., Goffner, D., & Molina, A.** (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front Plant Sci*, 4, 155.
- Denness, L., McKenna, J. F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M., Mansfield, J., Zipfel, C., & Hamann, T.** (2011). Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 156(3), 1364-1374.
- Diener, A. C., & Ausubel, F. M.** (2005). RESISTANCE TO *FUSARIUM OXYSPORUM* 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics*, 171(1), 305-321.
- Durrant, W. E., & Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 42, 185-209.
- Edgar, C. I., McGrath, K. C., Dombrecht, B., Manners, J. M., Maclean, D. C., Schenk, P. M., & Kazan, K.** (2006). Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen

- Fusarium oxysporum* in the model host *Arabidopsis thaliana*. *Australasian Plant Pathology*, 35(6), 581-591.
- Ellis, C., & Turner, J. G.** (2001). The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell*, 13, 1025-1033.
- Endler, A., & Persson, S.** (2011). Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 4(2), 199-211.
- Farmer, E. E., Alméras, E., & Krishnamurthy, V.** (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol*, 6(4), 372-378.
- Feussner, I., & Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 275-297.
- Flors, V., Ton, J., van Doorn, R., Jakab, G., Garcia-Agustin, P., & Mauch-Mani, B.** (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J*, 54(1), 81-92.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., & Solano, R.** (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol*, 5(5), 344-350.
- Freschi, L.** (2013). Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Front Plant Sci*, 4, 398.
- Funk, C. D.** (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294(5548), 1871-1875.
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., & Laloi, C.** (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28(11), 1091-1101.
- Gimenez-Ibanez, S., & Solano, R.** (2013). Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Front Plant Sci*, 4, 72.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 205-227.
- Gómez-Gómez, L., & Boller, T.** (2000). FLS2: An LRR Receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5, 1003-1011.
- Grant, M., & Lamb, C.** (2006). Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 9(4), 414-420.
- Haeggstrom, J. Z., & Funk, C. D.** (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev*, 111(10), 5866-5898.
- Hamann, T.** (2012). Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front Plant Sci*, 3, 77.
- Hamann, T., Bennett, M., Mansfield, J., & Somerville, C.** (2009). Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. *Plant J*, 57(6), 1015-1026.
- Hamberg, M., Ponce de Leon, I., Sanz, A., & Castresana, C.** (2002). Fatty acid alpha-dioxygenases. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68-69, 363-374.
- Hamberg, M., Sanz, A., & Castresana, C.** (1999). Oxidation of Fatty Acids in Higher Plants: IDENTIFICATION OF A PATHOGEN-INDUCIBLE OXYGENASE (PIOX) AS AN -DIOXYGENASE AND BIOSYNTHESIS OF 2-HYDROPEROXYLINOLENIC ACID. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 24503-24513.
- Hamberg, M., Sanz, A., Rodriguez, M. J., Calvo, A. P., & Castresana, C.** (2003). Activation of the fatty acid alpha-dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves. Formation of oxylipins protecting against cell death. *J Biol Chem*, 278(51), 51796-51805.
- Hammond-Kosack, K. E., & Parker, J. E.** (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 177-193.

- He, J. X., Gendron, J. M., Sun, Y., Gampala, S. S., Gendron, N., Sun, C. Q., & Wang, Z. Y. (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science*, 307(5715), 1634-1638.
- Heim, D. R., Skomp, J. R., Tschabold, E. E., & Larrinua, I. M. (1990a). Isoxaben inhibits the synthesis of acid insoluble cell wall materials in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 93, 695-700.
- Heim, D. R., Skomp, J. R., Tschabold, E. E., & Larrinua, I. M. (1990b). Isoxaben inhibits the synthesis of acid insoluble cell wall materials in *Arabidopsis thaliana*.pdf>. *Plant Physiol*, 93, 695-700.
- Hernandez-Blanco, C., Feng, D. X., Hu, J., Sanchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sanchez-Rodriguez, C., Anderson, L. K., Somerville, S., Marco, Y., & Molina, A. (2007). Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell*, 19(3), 890-903.
- Howe, G. A., & Schilmiller, A. L. (2002). Oxylin metabolism in response to stress. *Curr Opin Plant Biol*, 5, 230-236.
- Hua, J., & Meyerowitz, E. M. (1998). Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 94, 261-271.
- Huckelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol*, 45, 101-127.
- Hwang, I. S., & Hwang, B. K. (2010). The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiol*, 152(2), 948-967.
- Jalloul, A., Montillet, J. L., Assigbetsé, K., Agnel, J. P., Delannoy, E., Triantaphylidès, C., Daniel, J. F., Marmey, P., Geiger, J. P., & Nicole, M. (2002). Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *The plant journal*, 32, 1-12.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Kachroo, A., & Kachroo, P. (2009). Fatty Acid-derived signals in plant defense. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 153-176.
- Kidd, B. N., Edgar, C. I., Kumar, K. K., Aitken, E. A., Schenk, P. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2009). The mediator complex subunit PFT1 is a key regulator of jasmonate-dependent defense in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21(8), 2237-2252.
- Koo, A. J. K., & Howe, G. A. (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1571-1580.
- Koornneef, A., & Pieterse, C. M. (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol*, 146(3), 839-844.
- Kozelak-Rosenblum, M., Krol, A. C., Simmons, D. M., Goulah, C. C., Wroblewski, L., & Malkowski, M. G. (2008). His-311 and Arg-559 are key residues involved in fatty acid oxygenation in pathogen-inducible oxygenase. *J Biol Chem*, 283(36), 24962-24971.
- Kwon, S. J., Jin, H. C., Lee, S., Nam, M. H., Chung, J. H., Kwon, S. I., Ryu, C. M., & Park, O. K. (2009). GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant J*, 58(2), 235-245.
- Laloi, C., Apel, K., & Danon, A. (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol*, 7(3), 323-328.
- Lamb, C., & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 251-275.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., & Wendehenne, D. (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol*, 135(1), 516-529.
- Lanza, M., Garcia-Ponce, B., Castrillo, G., Catarcha, P., Sauer, M., Rodriguez-Serrano, M., Paez-Garcia, A., Sanchez-Bermejo, E., T, C. M., Leo del Puerto, Y., Sandalio, L. M., Paz-

- Ares, J., & Leyva, A.** (2012). Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid signaling and in its integration with the auxin response in plants. *Dev Cell*, 22(6), 1275-1285.
- Lehti-Shiu, M. D., Zou, C., Hanada, K., & Shiu, S. H.** (2009). Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiol*, 150(1), 12-26.
- Li, J., & Nam, K. H.** (2002). Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science*, 295(5558), 1299-1301.
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., & Walker, J. C.** (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, 110(213-222).
- Liavonchanka, A., & Feussner, I.** (2006). Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol*, 163(3), 348-357.
- Loake, G., & Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*, 10(5), 466-472.
- Logemann, J., Schell, J., & Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical biochemistry*, 163, 16-20.
- Lopez, M. A., Bannenberg, G., & Castresana, C.** (2008). Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr Opin Plant Biol*, 11(4), 420-427.
- Lopez, M. A., Vicente, J., Kulasekaran, S., Velloso, T., Martinez, M., Irigoyen, M. L., Cascon, T., Bannenberg, G., Hamberg, M., & Castresana, C.** (2011). Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. *Plant J*, 67(3), 447-458.
- Lozano-Duran, R., Macho, A. P., Boutrot, F., Segonzac, C., Somssich, I. E., & Zipfel, C.** (2013). The transcriptional regulator BZR1 mediates trade-off between plant innate immunity and growth. *Elife*, 2, e00983.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J.** (2011). Callose deposition: A multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact*, 24, 183-193.
- Maldonado, A. M., Derner, P., Dixon, R. A., Lamb, C., & Cameron, R. K.** (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419, 399-403.
- Malinovskiy, F. G., Fangel, J. U., & Willats, W. G.** (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Front Plant Sci*, 5, 178.
- Manfield, I. W., Orfila, C., McCartney, L., Harholt, J., Bernal, A. J., Scheller, H. V., Gilmartin, P. M., Mikkelsen, J. D., Paul Knox, J., & Willats, W. G.** (2004). Novel cell wall architecture of isoxaben-habituated *Arabidopsis* suspension-cultured cells: global transcript profiling and cellular analysis. *Plant J*, 40(2), 260-275.
- Meng, X., & Zhang, S.** (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol*, 51, 245-266.
- Michielse, C. B., & Rep, M.** (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol*, 10(3), 311-324.
- Mishina, T. E., & Zeier, J.** (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 50(3), 500-513.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., & Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(49), 19613-19618.
- Monaghan, J., & Zipfel, C.** (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol*, 15(4), 349-357.
- Montillet, J. L., Leonhardt, N., Mondy, S., Tranchimand, S., Rumeau, D., Boudsocq, M., Garcia, A. V., Douki, T., Bigeard, J., Lauriere, C., Chevalier, A., Castresana, C., & Hirt, H.** (2013). An abscisic acid-independent oxylipin pathway controls stomatal closure and immune defense in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 11(3), e1001513.

- Mosblech, A., Feussner, I., & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem*, 47(6), 511-517.
- Mueller, M. J., & Berger, S. (2009). Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1511-1521.
- Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. M., & Kang, S. (2000). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 91(2), 173-180.
- Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. M., & Kang, S. (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 91, 173-180.
- Nakayama, N., Takemae, A., & Shoun, H. (1996). Cytochrome P450foxy, a catalytically self-sufficient fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Biochem.*, 119, 435-440.
- Nalam, V. J., Keeretaweep, J., Sarowar, S., & Shah, J. (2012). Root-derived oxylipins promote green peach aphid performance on Arabidopsis foliage. *Plant Cell*, 24(4), 1643-1653.
- Nanda, A. K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., & Dunand, C. (2010). Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr Plant Biol*, 52(2), 195-204.
- Nomura, K., Melotto, M., & He, S. Y. (2005). Suppression of host defense in compatible plant-Pseudomonas syringae interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 8(4), 361-368.
- Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198(1), 249-266.
- Nuhse, T. S. (2012). Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Front Plant Sci*, 3, 280.
- Okubara, P. A., & Paulitz, T. C. (2005). Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective *Plant and soil*, 274, 215-226.
- Onkokesung, N., Galis, I., von Dahl, C. C., Matsuoka, K., Saluz, H. P., & Baldwin, I. T. (2010). Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in Nicotiana attenuata leaves. *Plant Physiol*, 153(2), 785-798.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D. W., & Goldman, S. L. (2004). Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in Arabidopsis. *Plant Biotechnol J*, 2(4), 359-366.
- Park, J.-H., Halitschke, R., Kim, H. B., Baldwin, I. T., Feldmann, K. A., & Feyereisen, R. (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal*, 31(1), 1-12.
- Penninckx, I., Thomma, B., Buchala, A., Métraux, J.-P., & Broekaert, W. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in arabidopsis. *Plant Cell*, 10, 2103-2113.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol*, 5(5), 308-316.
- Pietro, A. D., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol*, 4(5), 315-325.
- Ponce de León, I., Sanz, A., Hamberg, M., & Castresana, C. (2002). Involvement of the *Arabidopsis* alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *The plant journal*, 29, 61-72.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M. J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerre-Tugaye, M. T., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M., & Fournier, J. (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol*, 139(4), 1902-1913.

- Rancé, I., Fournier, J., & Esquerré-Tugayé, M. T. (1998). The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6554-6559.
- Robert-Seilantantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol*, 49, 317-343.
- Robert-Seilantantz, A., Navarro, L., Bari, R., & Jones, J. D. (2007). Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol*, 10(4), 372-379.
- Rosebrock, T. R., Zeng, L., Brady, J. J., Abramovitch, R. B., Xiao, F., & Martin, G. B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, 448(7151), 370-374.
- Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., & Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Rep*, 32(7), 1085-1098.
- Scheible, W. R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., & Somerville, C. (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in Arabidopsis *lrx1* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18), 10079-10084.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol*, 61, 263-289.
- Shabala, S., Shabala, S., Cuin, T. A., Pang, J., Percey, W., Chen, Z., Conn, S., Eing, C., & Wegner, L. H. (2010). Xylem ionic relations and salinity tolerance in barley. *Plant J*, 61(5), 839-853.
- Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr Opin Plant Biol*, 12(4), 459-464.
- Shah, J., Chaturvedi, R., Chowdhury, Z., Venables, B., & Petros, R. A. (2014). Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *Plant J*.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F.-F., Sharon, M., Browse, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A., & Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322), 400-405.
- Shen, Y., & Diener, A. C. (2013). Arabidopsis thaliana resistance to fusarium oxysporum 2 implicates tyrosine-sulfated peptide signaling in susceptibility and resistance to root infection. *PLoS Genet*, 9(5), e1003525.
- Smyth, G. K., Ritchie, M., Silver, J., Wettenhall, J., Thorne, N., McCarthy, D., Wu, D., Hu, Y., Shi, W., Phipson, B., Oshlack, A., de Graaf, C., Langaas, M., Ferkingstad, E., Davy, M., Pepin, F., & Choi, D. (2005). Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*, 397-420.
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe*, 3(6), 348-351.
- Staswick, P. E. (2008). JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci*, 13(2), 66-71.
- Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2009). Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol*, 12(5), 548-555.
- Steppuhn, A., Gaquerel, E., & Baldwin, I. T. (2010). The two alpha-dox genes of *Nicotiana attenuata*: overlapping but distinct functions in development and stress responses. *BMC Plant Biol*, 10, 171.
- Stone, P. J., O'Callaghan, K. J., Davey, M. R., & Cocking, E. D. (2001). *Azorhizobium caulinodans* ORS571 colonizes the xylem of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 14, 93-97.
- Sun, Y., Fan, X. Y., Cao, D. M., Tang, W., He, K., Zhu, J. Y., He, J. X., Bai, M. Y., Zhu, S., Oh, E., Patil, S., Kim, T. W., Ji, H., Wong, W. H., Rhee, S. Y., & Wang, Z. Y. (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev Cell*, 19(5), 765-777.

- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci*, 17(5), 260-270.
- Thatcher, L. F., Manners, J. M., & Kazan, K. (2009). *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in Arabidopsis. *Plant J*, 58(6), 927-939.
- Thomma, B., Penninckx, I., Broekaert, W., & Cammue, B. (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology*, 13, 63-68.
- Tjamos, E. C., & Beckman, C. H. (1989). Vascular wilt diseases of plants: Basic studies and control. *Berlin: Springer-Verlag*.
- Triantaphylides, C., & Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci*, 14(4), 219-228.
- Truman, W., Bennett, M. H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., & Grant, M. (2007). Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), 1075-1080.
- Tsitsigiannis, D. I., & Keller, N. P. (2007). Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol*, 15(3), 109-118.
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 13(4), 459-465.
- Tsuda, K., Masanao, S., Stoddard, T., Glazebrook, J., & Katagiri, F. (2009). Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genetics*, 5(12).
- Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Front Plant Sci*, 3, 85.
- Uppalapati, S. R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B. N., Anand, A., Mysore, K. S., & Bender, C. L. (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of Salicylic Acid accumulation in Tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 955-965.
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44, 135-162.
- Vellosillo, T., Aguilera, V., Marcos, R., Bartsch, M., Vicente, J., Cascon, T., Hamberg, M., & Castresana, C. (2013). Defense activated by 9-lipoxygenase-derived oxylipins requires specific mitochondrial proteins. *Plant Physiol*, 161(2), 617-627.
- Vellosillo, T., Martinez, M., Lopez, M. A., Vicente, J., Cascon, T., Dolan, L., Hamberg, M., & Castresana, C. (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*, 19(3), 831-846.
- Vicente, J., Cascon, T., Vicedo, B., Garcia-Agustin, P., Hamberg, M., & Castresana, C. (2012). Role of 9-lipoxygenase and alpha-dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Mol Plant*, 5(4), 914-928.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 177-206.
- Vlot, A. C., Klessig, D. F., & Park, S. W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol*, 11(4), 436-442.
- Vorwerk, S., Somerville, S., & Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci*, 9(4), 203-209.
- Walton, J. D. (1994). Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol*, 104, 1113-1118.
- Wang, X., & Chory, J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science*, 313(5790), 1118-1122.
- Wang, Z. Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental cell*, 2, 505-513.

- Wasternack, C., & Hause, B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot*, 111(6), 1021-1058.
- Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F., & Staskawicz, B. J.** (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *The plant cell*, 3, 49-59.
- Wolf, S., Mravec, J., Greiner, S., Mouille, G., & Hofte, H.** (2012). Plant cell wall homeostasis is mediated by brassinosteroid feedback signaling. *Curr Biol*, 22(18), 1732-1737.
- Wu, J., & Baldwin, I. T.** (2010). New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 1-24.
- Xie, D., Feys, B. J. F., James, S., Nieto-Rostro, M., & Turner, J. G.** (1998). COI1: An *Arabidopsis* Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. *Science*, 280(5366), 1091-1094.
- Yin, H., Zhou, Y., Zhu, M., Hou, S., Li, Z., Zhong, H., Lu, J., Meng, T., Wang, J., Xia, L., Xu, Y., & Wu, Y.** (2013). Role of mitochondria in programmed cell death mediated by arachidonic acid-derived eicosanoids. *Mitochondrion*, 13(3), 209-224.
- Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-García, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J.** (2002a). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, 109, 181-191.
- Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-García, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J.** (2002b). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, 109, 181-191.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., & Durner, J.** (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15811-15816.
- Zhang, C., Czymmek, K. J., & Shapiro, A. D.** (2003). Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *arabidopsis* hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 16, 962-972.
- Zhu, Q. H., Stephen, S., Kazan, K., Jin, G., Fan, L., Taylor, J., Dennis, E. S., Helliwell, C. A., & Wang, M. B.** (2013). Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in *Arabidopsis* using RNA-seq. *Gene*, 512(2), 259-266.
- Zipfel, C.** (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 20(1), 10-16.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., & Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749-760.
- Zipfel, C., & Robatzek, S.** (2010). Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? *Plant Physiol*, 154(2), 551-554.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E., Jones, J., Felix, G., & Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428, 764-767.
- Zolobowska, L., & Van Gijsegem, F.** (2006). Induction of lateral root structure formation on *Petunia* roots: A novel effect of GM1000 *Ralstonia solanacearum* infection impaired in *hrp* mutants. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 19, 597-606.